

ANÁLISE MOLECULAR DE UMA ALENO ÓXIDO SINTASE,
LOCALIZADA NOS CLOROPLASTOS, ENVOLVIDA NO MECANISMO
DE RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS DE MARACUJÁ
(*Passiflora edulis* Sims *flavicarpa flavicarpa*)

CÉSAR LUIS SIQUEIRA JUNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANÁLISE MOLECULAR DE UMA ALENO ÓXIDO SINTASE,
LOCALIZADA NOS CLOROPLASTOS, ENVOLVIDA NO MECANISMO
DE RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS DE MARACUJÁ
(*Passiflora edulis* Sims *flavicarpa flavicarpa*)

CÉSAR LUIS SIQUEIRA JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título
de Doutor em Biociências e
Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Tânia Jacinto Freitas da Silva

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
SETEMBRO – 2007

ANÁLISE MOLECULAR DE UMA ALENO ÓXIDO SINTASE,
LOCALIZADA NOS CLOROPLASTOS, ENVOLVIDA NO MECANISMO
DE RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS DE MARACUJÁ
(*Passiflora edulis* Sims *flavicarpa flavicarpa*)

CÉSAR LUIS SIQUEIRA JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título
de Doutor em Biociências e
Biotecnologia.

Apresentada em 26 de Setembro de 2007

Comissão examinadora:

Prof^a. Anna L. Okorokova Façanha (Dr^a. em Ciências) – UENF

Prof^a. Antônio Elenir Amâncio Oliveira (Dr^a. em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. José Roberto da Silva (Dr. em Biociências e Biotecnologia) – UNIG

Prof^a. Tânia Jacinto Freitas da Silva (Dr^a. em Ciências) – UENF

Orientadora

Dedico esta tese a minha esposa Flávia,
minha filha Maria Carolina e ao meu filho
Pedro Enrique.



À Deus, por todas as graças consedidas a mim. Seguir seus ensinamentos nos faz pessoas melhores.

À minha esposa Flávia, e meus filhos Pedro Enrique e Maria Carolina, por representarem tudo aquilo que hoje possuo na vida, e por demonstrarem a cada dia o amor que sentem por mim. Eu os amo, com todo o meu coração

À meus pais e irmãos por trazer à minha vida uma base tão forte e segura, fazendo-me acreditar a todo tempo que tudo que queremos, podemos conseguir.

À minha orientadora Tânia Jacinto por todos os anos de trabalho e ensinamentos que fizeram de mim o profissional que sou hoje.

À meus amigos de Bancada, Bruno, Sylvio, Hérika, pela amizade e descontração em todos os momentos de convívio. Em especial à amiga Hérika por seu apoio e dedicação na fase final desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, que durante todos esses anos, demonstraram sua amizade e seu carinho em todos os momentos.

Aos técnicos Telma, Rívia, Adão e Leandro, pelo apoio e amizade no laboratório.

Ao revisor desta Tese, André Carvalho, pelo seu brilhante trabalho e também pela amizade.

Aos membros da banca, Profa. Ana, Profa. Elenir e Prof. José Roberto por terem aceitado o convite de avaliarem este trabalho.

À professora Maura Cunha pela ajuda e colaboração com as análises de microscopia.

Ao profs. Turan e Ana Carolina e a seus respectivos grupos de pesquisa pela colaboração nos experimentos de hibridização e sequenciamento de DNA.

À todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram presentes em momentos de alegria e de tristeza, de sucesso ou de derrota durante esses anos, demonstrando sempre seu companheirismo e sua amizade. À vocês, o meu muito obrigado!!!



ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
ÍNDICE	II
LISTA DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIV
1.INTRODUÇÃO	1
1.1.CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2.A INTERAÇÃO ENTRE PLANTAS E INSETOS E OS MECANISMOS DE DEFESA DE PLANTAS	2
1.3.AS DEFESAS DIRETAS INDUZIDAS	5
1.4.A SINALIZAÇÃO DE DEFESA EM PLANTAS	8
1.4.1.A VIA DO OCTADECANÓIDE.....	8
A BIOSÍNTESE DE OXILIPINAS E SUAS FUNÇÕES NO MECANISMO DE DEFESA	11
A ALENO OXIDO SINTASE	15
1.5. O MARACUJÁ.....	18
2.OBJETIVOS	22
2.1.OBJETIVO GERAL.....	22
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.MATERIAL BIOLÓGICO	23
3.1.1.SEMENTES DE MARACUJÁ	23
3.1.2.PLANTAS DE MARACUJÁ E CONDIÇÕES DE CULTIVO	23
3.1.3.BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	23
3.1.4.ANTICORPOS.....	23
3.2.ANÁLISE DE UMA PROTEÍNA IMUNO RELACIONADA À AOS DE TOMATE POR DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA, SDS-PAGE E “WESTERN BLOT”	24



3.2.1. TRATAMENTO DE PLANTAS DE MARACUJÁ POR EXPOSIÇÃO A VAPORES DE METIL JASMONATO	24
3.2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO FOLIAR.....	24
3.2.3. DOSAGEM DO TEOR PROTÉICO	24
3.2.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE METABOLIZADORA DE 13-HIDROPERÓXIDOS PELAS ENZIMAS CONTIDAS NO EXTRATO BRUTO FOLIAR DE PLANTAS DE MARACUJÁ	25
3.2.4.1. PREPARO DE HIDROPERÓXIDOS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	24
3.2.4.2. ENSAIO DE ATIVIDADE METABOLIZADORA DE HIDROPERÓXIDOS	25
3.2.5. ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10 % (SDS-PAGE).....	26
3.2.5.1. COLORAÇÃO POR AZUL DE COOMASSIE.....	25
3.2.5.2. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS FIXADAS EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE.....	26
3.3. CLONAGEM MOLECULAR DO cDNA DE UMA AOS DE FOLHAS DE MARACUJÁ	27
3.3.1. CLONAGEM MOLECULAR DO FRAGMENTO CORRESPONDENTE A REGIÃO CENTRAL (CORE) DA AOS.....	27
3.3.1.1. DESENHO DE INICIADORES DEGENERADOS PARA A OBTENÇÃO DE UM FRAGMENTO (CORE) DA AOS	27
3.3.1.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE FOLHAS DE MARACUJÁ	27
3.3.1.3. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE RNA TOTAIS	28
3.3.1.4. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA PARCIAL DA AOS DE MARACUJÁ POR REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERTE (RT)	28
3.3.1.5. AMPLIFICAÇÃO DA SEGUNDA FITA DE CDNA PARCIAL DA AOS DE MARACUJÁ POR PCR.....	29
3.3.1.6. ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO DE CDNA DA AOS DE MARACUJÁ.....	31



3.3.1.7. ANÁLISE DOS CLONES POSITIVOS POR EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DOS VETORES	32
3.3.1.8. SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DE cDNA DA AOS DE MARACUJÁ	33
3.3.1.9. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADA PELO FRAGMENTO E COMPARAÇÃO COM ENZIMAS DE OUTRAS ESPÉCIES DE PLANTAS.....	33
3.3.2. CLONAGEM MOLECULAR DO FRAGMENTO CORRESPONDENTE A REGIÃO 3' DO cDNA DA AOS	34
3.3.2.1. DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DA REGIÃO 3' DO cDNA DE AOS	34
3.3.2.2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3' DO CDNA DA AOS DE MARACUJÁ POR REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA.....	34
3.3.2.3. AMPLIFICAÇÃO DA SEGUNDA FITA DA REGIÃO 3' DO CDNA DA AOS DE MARACUJÁ POR PCR	36
3.3.2.4. ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DA REGIÃO 3' DO CDNA DA AOS DE MARACUJÁ	36
3.3.3. CLONAGEM MOLECULAR DE FRAGMENTOS DA REGIÃO 5' DO cDNA DA AOS DE FOLHAS DE MARACUJÁ	37
3.3.3.1. DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DA REGIÃO 5' do cDNA DA AOS	37
3.3.3.2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 5' DO cDNA DA AOS DE MARACUJÁ POR RACE 5'	39
3.3.3.3. ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DA REGIÃO 5' DO CDNA DA AOS DE MARACUJÁ	40
3.3.4. ANÁLISE DA SOBREPOSIÇÃO DA SEQUÊNCIA ENTRE OS FRAGMENTOS DE cDNA PARCIAL DE AOS OBTIDOS	40
3.3.5. CLONAGEM MOLECULAR DO cDNA TOTAL AOS DE FOLHAS DE MARACUJÁ	42



3.3.5.1. DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DO cDNA DA AOS	42
3.3.5.2. AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DA SEGUNDA FITA DO cDNA TOTAL DA AOS DE MARACUJÁ POR PCR	42
3.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADAS PELO cDNA DA AOS	43
3.5. ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE AOS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE BIÓTICO	43
3.5.1. MATERIAL VEGETAL PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE AOS.....	44
3.5.2. ELETROFORESE, EM GEL DESNATURANTE, DE RNA TOTAL PARA ANÁLISE DE RNAs	44
3.5.3. TRANSFERÊNCIA DO RNAs PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE	44
3.5.4. MARCAÇÃO DE SONDA RADIOATIVA ESPECÍFICA DE AOS	45
3.5.5. PURIFICAÇÃO DAS SONDAS MARCADAS RADIOATIVAMENTE	45
3.5.6. HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA DE NITROCELULOSE COM A SONDA RADIOATIVA.....	46
3.6. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE DE AOS EM PLANTAS DE MARACUJÁ	46
3.6.1. MATERIAL VEGETAL PARA ANÁLISE DO MATERIAL GENÔMICO	46
3.6.2. DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO	47
3.6.3. ELETROFORESE DE DNA GENÔMICO	48
3.6.4. TRANSFERÊNCIA DO DNA PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE E HIBRIDIZAÇÃO COM SONDA RADIOATIVA	49



3.7.IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA HOMÓLOGA A AOS DE TOMATE EM FOLHAS DE PLANTAS DE MARACUJÁ	49
3.7.1.PREPARO DAS AMOSTRAS DE FOLHAS, DESIDRATAÇÃO E INCLUSÃO EM RESINA LR Gold.....	49
3.7.2.IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA HOMÓLOGA A AOS DE TOMATE.....	50
3.8DETECÇÃO DA INDUÇÃO DE PROTEÍNAS DEFENSIVAS: INIBIDORES DE PROTEÍNASES CISTEÍNICA POR FERIMENTO MECÂNICO E TRATAMENTO COM METIL JASMONATO.....	51
3.8.1.OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO DO TECIDO FOLIAR DE PLANTAS DE MARACUJÁ	51
3.8.2.ANÁLISE DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE PROTEINASE INDUZIDOS EM FOLHAS DE MARACUJÁ.....	51
4.RESULTADOS	53
4.1. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS COM ATIVIDADE DE METABOLIZAÇÃO DE 13-HIDROPERÓXIDOS EM PLANTAS DE MARACUJÁ	54
4.2. DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA COM IMUNO RELACIONADA À AOS DE TOMATE EM FOLHAS DE MARACUJÁ.....	55
4.3.CLONAGEM DE UM FRAGMENTO DE cDNA DA AOS DO MARACUJÁ	57
4.4.CLONAGEM DO FRAGMENTO DE CDNA DA REGIÃO 3' DA AOS DO MARACUJÁ.....	62
4.5.CLONAGEM DO FRAGMENTO DE CDNA DA REGIÃO 5' DA AOS DO MARACUJÁ.....	65
4.6.ANÁLISE DO cDNA TOTAL DA AOS DO MARACUJÁ POR SOBREPOSIÇÃO DOS FRAGMENTOS.....	68
4.7. ANÁLISE DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE AS AOS DE PLANTAS E IDENTIFICAÇÃO COMO UMA ENZIMA DA SUBFAMÍLIA CYP74 DE CITOCROMOS P450	70



4.8.LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DA PROTEÍNA AOS PRODUZIDA EM FOLHAS DE MARACUJÁ.....	77
4.9.ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE AOS EM FOLHAS DE MARACUJÁ EM RESPOSTA A FERIMENTO MECÂNICO E TRATAMENTO COM METIL JASMONATO.....	78
4.10.ANÁLISE DO GENE CODIFICADOR DE AOS DE MARACUJÁ POR “SOUTHERN BLOT”	81
4.11.INDUÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASE CISTEÍNICA EM FOLHAS DE MARACUJÁ EM RESPOSTA A INDUÇÃO DE AOS.....	82
5.DISSCUSSÃO	84
5.1.INDUÇÃO DE UMA PROTEÍNA IMUNO RELACIONADA À AOS EM PLANTAS DE MARACUJÁ COM ATIVIDADE METABOLIZADORA DE HIDROPERÓXIDOS.....	84
5.2.CLONAGEM E ANÁLISE DO cDNA DA AOS DE FOLHAS DE MARACUJA	87
5.3.LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA AOS DE MARACUJÁ.....	93
5.4.ANÁLISE DO GENE DE AOS E SUA EXPRESSÃO EM RESPOSTA A FERIMENTO E TRATAMENTO COM METIL JASMONATO.....	95
5.5.INDUÇÃO DE PROTEÍNAS DEFENSIVAS EM TECIDO FOLIAR DE PLANTAS DE MARACUJÁ.....	97
6.CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS	99
8. ANEXOS	113

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1. Representação esquemática da ativação do mecanismo de defesa direta e indireta contra o ataque de insetos herbívoros	4
Figura 2. Modelo da via sinalização da resposta de defesa de plantas. Adaptado de sivasankar <i>et al</i> (2000)	9
Figura 3. Modelo da via das lipoxigenases compreendendo a biosíntese do ácido jasmônico. Adaptado de wasternack <i>et al.</i> , (1998).....	12
Figura 4. Metabolismo de hidroperóxidos de ácido graxo por proteínas induzidas em plantas de maracujá pelo tratamento com MJ..	54
Figura 5. Acúmulo de proteína homóloga a AOS de tomate em folhas de plantas de maracujá após tratamento de 24 h com metil jasmonato.....	56
Figura 6. Visualização eletroforética do fragmento amplificado de cDNA da aos de maracujá por RT-PCR, em gel de agarose 1.2 %,	58
Figura 7. Visualização eletroforética do DNA plasmidial das colônias brancas clivadas com enzima de restrição <i>eco</i> RI, em gel de agarose 1,2 %.	59
Figura 8. Seqüência de nucleotídeos do fragmento de 950 pb do cDNA de aos de maracujá e a seqüência de aminoácidos deduzida da enzima.	60
Figura 9. Comparação inicial da seqüência de aminoácidos deduzida de cDNA de aos de plantas.	61
Figura 10. Visualização eletroforética do fragmento da região 3' de cDNA da aos de maracujá amplificado por RT-PCR em gel de agarose 1,2 %.	63
Figura 11. Comparação da seqüência de aminoácidos deduzida do fragmento da região 3' do cDNA de aos de plantas.	64
Figura 12. Visualização eletroforética do fragmento da região 5' de cDNA da AOS de maracujá amplificado por race 5', em gel de agarose 1,2 %.	66
Figura 13. Comparação da seqüência de aminoácidos deduzida do fragmento da região 5' do cDNA de aos de plantas.	67
Figura 14. Seqüência completa do cDNA da aos de maracujá.	69
Figura 15. Comparação da seqüência de aminoácidos das proteínas AOS de plantas com a seqüência de 504 aminoácidos deduzida a partir do cDNA	72



Figura 16. Árvore filogenética sem raiz de proteínas AOS preditas ou conhecidas de plantas.....	74
Figura 17. Árvore filogenética sem raiz de proteínas da subfamília CYP74 de citocromos P450.....	75
Figura 18. Imunolocalização da AOS em cortes de folhas de maracujá.	78
Figura 19. Análise da expressão do gene codificador de aos em folhas de maracujá por “ <i>northern blot</i> ”.....	80
Figura 20. Análise do gene codificador de aos de maracujá por “ <i>southern blot</i> ”.	81
Figura 21. Indução de inibidores de proteinase cisteínica em folhas de maracujá ...	83
Esquema 1. Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a obtenção do fragmento de 950 pb do cDNA da AOS de maracujá	30
Esquema 2. Vetor pcr [®] 2.1 topo [®] produzido pela invitrogen, utilizado para a clonagem do fragmento amplificado	32
Esquema 3. Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a obtenção dos fragmentos referentes a região 3’ do cDNA da AOS de maracujá.....	35
Esquema 4. Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a obtenção do fragmento referentes a região 5’ do cDNA da AOS de maracujá.....	38
Esquema 5. Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a obtenção do cDNA total da AOS de maracujá.....	41



ABREVIATURAS

13-HPOT.....	13-Hidroperóxidos de Ácido Linolênico
ABA.....	Ácido Abscísico
AJ	Ácido Jasmônico
AOC	Aleno Óxido Ciclase
AOS.....	Aleno Óxido Sintase
BANA.....	N-benzoyl-1-Arginine-2-Naphthylamide
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA.....	DNA complementar
DAB	Diaminobenzidina
DEPC.....	Diethylpirocarbonato
DES	Divinil Ester Sintase
DMSO.....	Dimetil Sulfóxido
DNTP	Dinucleotideo Tri-fosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
HPL.....	Hidroperoxi Liase
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodaltons
LB.....	Luria Bertani
LOX	Lipoxigenase
MJ	Metil Jasmonato
MOPS.....	Ácido 3-(N-morfolino) Propano Sulfônico
NADPH.....	Nicotiamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
OPDA	Ácido-Oxo-Fitodienoico
ORF.....	“Open Reading Frame”
PBS	“Phosphate Saline Buffer”
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
PDA.....	Ácido Fitodienóico
PI	Inibidores de Proteinase
PINII	Inibidores de Proteinase Serínica (II)



PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PPO	Polifenoloxidase
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RACE	Amplificação Rápida das Terminações do cDNA
RH	Resposta Hipersensível
ROS	Espécies Reactivas de Oxigênio
RT	Reação da Transcrição Reversa
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio
TRIS	Tris (hidróximetil) Amino Etano

RESUMO

O Ácido Jasmônico (AJ), metabólito da via do octadecanóide, desempenha um papel vital nas respostas de defesa/estresse de plantas. Estudos anteriores demonstraram a indução de uma 13-lipoxigenase (13-LOX), em folhas de maracujá em resposta a Metil Jasmonato (MJ), sendo essa enzima localizada nos cloroplastos. Neste trabalho, nós investigamos a síntese de uma Aleno Óxido Sintase (AOS) em folhas de maracujá em resposta a ferimento mecânico e tratamento com MJ. As AOS são enzimas planta-específicas da família dos citocromos P450 que catalizam a desidratação de 13(S)-Hidroperóxidos do Ácido Octadecatrienóico à aleno óxidos, a primeira reação específica da biossíntese de AJ. Ensaios espectrofotométricos mostraram que a exposição a MJ por 24 h causaram um forte aumento da atividade metabolizadora de 13-hidroperóxidos de ácido linolênico (13-HPOT) em tecidos foliares. Análises por “western blot”, usando anticorpos policlonais produzidos contra AOS de tomate indicaram fortemente, que pelo menos, parte da capacidade de metabolização dos 13 HPOT pode ser atribuída à atividade de uma AOS. Em adição, nós documentamos a clonagem molecular e caracterização de um novo cDNA de maracujá altamente homólogo ao gene de Aleno Óxido Sintase (EC 4.2.1.92) AOS, mostrando significativo nível de similaridade com AOS de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Baseado na comparação de sequência, o cDNA total da AOS denominado *PfAOS* é um novo membro da subfamília CYP74A de citocromos P450 e existe como um gene de cópia única no genoma do maracujazeiro. A sequência codificadora de 1.512 pb do cDNA-AOS codifica uma suposta proteína de 504 aminoácidos (aa) contendo uma sequência de direcionamento para cloroplastos. Sob tratamento de folhas de maracujá com MJ, a proteína AOS é acumulada dentro dos cloroplastos, corroborando a localização subcelular predita. Nós verificamos que os transcritos de *PfAOS* são positivamente regulados sistemicamente em resposta ao ferimento em folhas de plantas de maracujá como já descrito para diversas AOS de dicotiledôneas. A resposta na transcrição ocorre de maneira rápida e transitória. Os transcritos de *PfAOS* foram também fortemente regulados positivamente em resposta ao tratamento com MJ. Demais análises bioquímicas demonstraram que tais tratamentos causam o aumento de inibidor(es) de papaína nos tecidos foliares.



Juntos, esses resultados sugerem fortemente a importância da PfAOS nas vias de resposta de defesa de plantas de maracujá.

ABSTRACT

The octadecanoid pathway metabolite jasmonic acid (JA) plays a vital role in plants defense/stress responses. Previous studies demonstrated the induction of a 13-chloroplast-localized lipoxygenase (13-LOX) in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate (MJ) being this enzyme localized at chloroplasts. In this work, we have investigated the synthesis of an allene oxide synthase (AOS) in passion fruits leaves in response to mechanical wound and MJ treatment. AOS are enzymes plant-specific of the cytochrome P450s family that catalyzes the dehydration of 13(S)-hydroperoxy octadecatrienoic acid to an allene oxide, the first specific reaction in JA biosynthesis. Spectrophotometric assays showed that 24 h exposure of MJ caused a high increase of 13-hydroperoxy linolenic acid (13-HPOT) metabolizing activity in leaf tissue. Western blot analysis using polyclonal antibodies against tomato AOS strongly indicate that at least part of the 13-HPOT metabolizing capacity can be attributed to AOS activity. In addition, we reported the molecular cloning and characterization of a novel passion fruit cDNA highly homologous to the allene oxide synthase (EC 4.2.1.92) AOS gene, showing significant similarity level with dicotyledoneous e monocotyledoneous plants AOS. Based on sequence comparisons, the full-length cDNA of AOS designed as *PfAOS* is a novel member of the cytochrome P450 CYP74A subfamily and exists as a single copy gene in the passion fruit genome. The 1,512 bp open reading frame of the AOS-cDNA codes for a putative protein of 504 aminoacid (aa) residues containing a chloroplast target sequence. Upon MJ treatment in passion fruit leaves, the AOS protein is accumulated within chloroplasts, corroborating the predicted subcellular localization. We found that the transcripts of *PfAOS* are up-regulated systemically in response to wound in passion fruit leaves as reported for several dicot AOSs. The response in transcripts occurred rapidly and transiently. Transcripts of *PfAOS* were also up-regulated strongly in response to MJ treatment. Further biochemical analysis demonstrated that such treatments caused an increase of papain inhibitor(s) in leaf tissue. Together, these results strongly suggest the importance of *PfAOS* in passion fruit defense response pathway(s).



1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A agricultura é uma das formas de obtenção de alimentos com grande destaque mundial. Várias espécies diferentes foram introduzidas em inúmeras regiões, respeitando as condições necessárias para o cultivo. O desenvolvimento da agricultura ocasionou em consequência um aumento acelerado na população mundial, que já era amplamente distribuída (Raven *et al.*, 2001). Basta pensar que, em 1950, a população mundial atingia um total de 2,5 bilhões, e no fim do século XX esse número havia aumentado, para aproximadamente 6 bilhões de pessoas. Esse aumento levou a uma demanda de alimentos cada vez maior, fazendo com que a agricultura passasse a ser vista como uma fonte substancial de alimentos. Nesse contexto, surge uma nova preocupação de criar uma agricultura sustentável, visando ao máximo a redução dos danos causados por problemas fitossanitários às culturas. O ataque de pragas, doenças fungicas e bacterianas e ainda por plantas invasoras que levam redução da quantidade e qualidade do produto com consequentemente, a perda de aproximadamente 30% da produção agrícola mundial anual (Aragão, 2003; Ghini e Bettiol, 2000).

Dentre as técnicas mais utilizadas, se destaca a seleção genética de plantas mais produtivas e resistentes às pragas, o que levou ao processo hoje conhecido de *melhoramento vegetal*. Buscava-se então, a domesticação de espécies vegetais, com grande variabilidade, objetivando a seleção de espécies mais adequadas ao cultivo. Partindo-se de cruzamentos clássicos entre plantas de mesma espécie ou até mesmo de espécies distintas, foram obtidos vários híbridos resistentes a doenças, e que possuem grande importância econômica atual, como é o caso do trigo, do tritcale e do fumo (Aragão, 2003; Raven *et al.*, 2001).

A técnica de melhoramento genético, no entanto, foi crescentemente substituída nas últimas décadas pelos métodos químicos convencionais de utilização maciça de pesticidas na tentativa de proteger de plantas contra o ataque de pragas. Além de sua simplicidade no manuseio, a previsibilidade e a não necessidade de conhecimento da ecologia e fisiologia das espécies envolvidas pelo usuário, tornaram os pesticidas uma metodologia atraente para os agricultores



(Atkinson e McKinlay, 1995). Contudo, sabe-se hoje, que cerca de 90% dos pesticidas aplicados no campo não atingem o alvo, sendo acumulados no solo e nos reservatórios de água, fazendo com que essa prática se torne não adequada (Ghini e Bettiol, 2000).

Em contrapartida, a necessidade do desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de pesticidas, colocou a biotecnologia como uma das estratégias mais promissoras de obtenção de culturas melhoradas (Raven *et al.*, 2001). A manipulação genética de características individuais de espécies de plantas se tornou um desafio aos biólogos moleculares, que buscam o aperfeiçoamento de técnicas que permitam a obtenção de genótipos bem caracterizados, os quais, juntamente com os mecanismos de plasticidade fenotípica levem ao entendimento de como as plantas interagem com seus inimigos naturais (Dicke *et al.*, 2004). Hoje, vários estudos tem por finalidade produzir e divulgar a eficácia de plantas geneticamente modificadas que possuem novas propriedades originadas pela expressão de novos genes, como é o caso de plantas de milho que foram transformadas com o gene de uma bactéria, o *Bacillus turigiensis*, o qual codifica uma proteína (toxina Bt) tóxica a larvas de insetos (van der Biezen, 2001).

1.2. A INTERAÇÃO ENTRE PLANTAS E INSETOS E OS MECANISMOS DE DEFESA DE PLANTAS

As plantas são constantemente expostas a diversos agentes bióticos que variam seus modos de ataques, compreendendo uma escala espacial que vai desde a atuação de um patógeno sobre uma simples célula vegetal (Somssich e Hahlbrock, 1998), até a seleção de uma planta hospedeira de acordo com suas características por um herbívoro (Hay, 1986).

Apesar de serem organismos sésseis e ainda não apresentarem um mecanismo de defesa bem caracterizado como o sistema imune de animais, as plantas desenvolveram diversas estratégias de resposta que permitem a sobrevivência e adaptação a essas adversidades ambientais (Creelman e Mullet, 1997; Agrawal *et al.*, 2002b). Grandes avanços foram feitos, nas últimas décadas, na obtenção de informações sobre como as plantas interagem, à nível celular, com

seus agressores (Gozzo, 2003). Sabe-se que as respostas de defesa da planta, à infecção por esses agentes, são dinâmicas e têm sido estudadas por culminarem em mudanças físicas e bioquímicas na planta envolvendo quatro principais eventos: (1) a percepção do sinal pela célula da planta, (2) transdução intracelular deste sinal de reconhecimento, (3) síntese de moléculas de defesa, (4) transporte das moléculas de defesa para sítios estratégicos (Dixon *et al.*, 1994; Benhamou, 1996). Esses mecanismos moleculares têm revelado estreita similaridade com a resposta imune inata observada em insetos e mamíferos (Camera *et al.*, 2004).

Em contraste ao conhecimento sobre as interações entre planta e patógenos, pouco ainda foi elucidado sobre como as plantas reconhecem o ataque de insetos herbívoros. Plantas e insetos têm coexistido ao longo milhões de anos, desenvolvendo uma relação que afeta desde a bioquímica básica até a genética populacional de ambos, sendo tão comum, que todas as espécies de plantas conhecidas são atacadas por pelo menos uma espécie de inseto. Essa relação tem sido estudada por ser um fator determinante para o aumento da diversidade de ambos, insetos e plantas (Gatehouse, 2002).

De um modo geral, as plantas respondem ao ataque de um herbívoro utilizando estratégias de defesas que podem ser classificadas em indiretas, as quais incluem organismos de níveis tróficos superiores (predadores naturais do inseto) desempenhando funções de defesa; ou diretas, que exercem imediato efeito negativo sobre o predador (Arimura *et al.*, 2005). As defesas indiretas estão associadas à produção de compostos metabólicos que atraem inimigos naturais do inseto agressor, tais como parasitas ou predadores desse. Enquanto isso, as defesas diretas previnem o ataque do inseto pela produção de barreiras físicas (a lignificação, a produção de resinas e tricomas); por barreiras químicas: com a produção de metabólicos secundários (fenilpropanóides, terpenoides, alcalóides e ácidos graxos); ou ainda pela produção de compostos tóxicos e proteínas de defesa específicas (inibidores de proteinase, por exemplo), que são percebidas pelo inseto como um agente tóxico, impedindo a alimentação ou oviposição (Agrios, 1997; Bennett e Wallsgrove, 1994; Wittstock e Gershenzon, 2002; Arimura *et al.*, 2005) (Fig. 1).

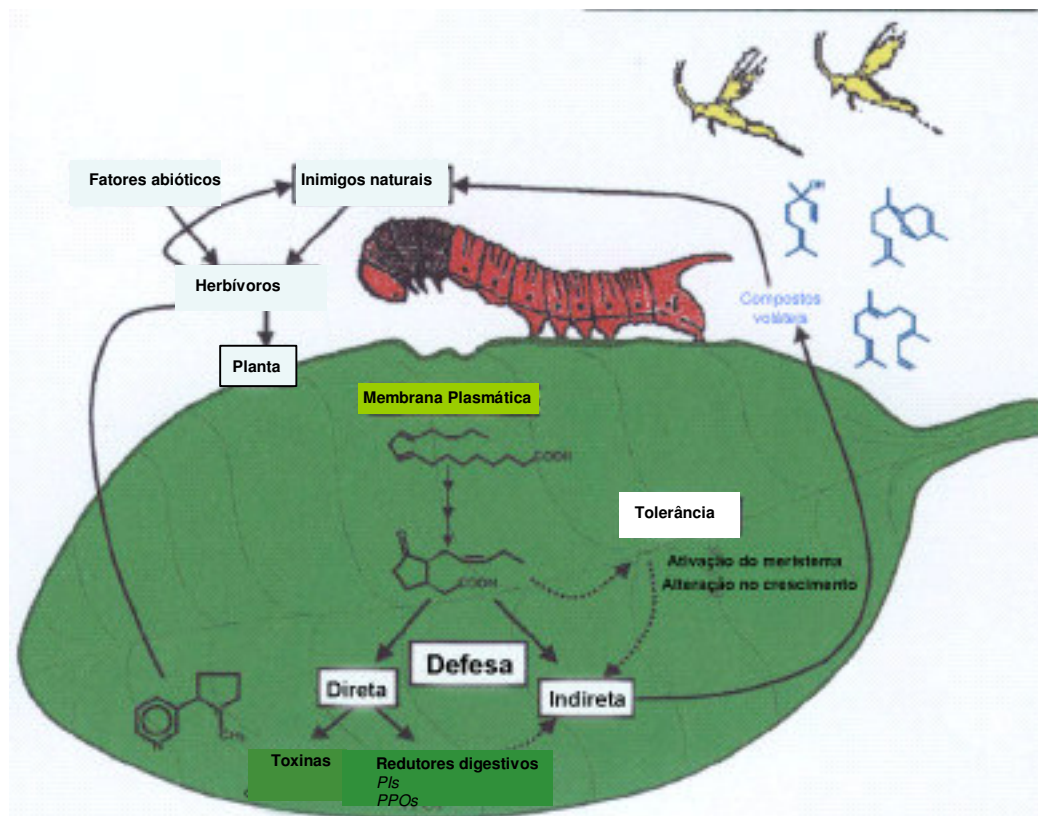


Figura 1 – Representação esquemática da ativação do mecanismo de defesa direta e indireta contra o ataque de insetos herbívoros. As defesas diretas aumentam a resistência ao ataque do predador, enquanto que as defesas indiretas aumentam a mortalidade do herbívoro através de interação entre níveis tróficos, atraindo inimigos naturais do predador pela liberação de compostos voláteis. As siglas PIs e PPOs representam os inibidores de proteinase e polifenoloxidasas, respectivamente. (adaptado de Baldwin e Preston, 1999)

Em adição, ambas as estratégias de defesa indiretas e diretas podem ser empregadas na planta, de maneira constitutiva ou mesmo de forma induzidas, nas quais os compostos são sintetizados em resposta ao ataque do inseto. De maneira interessante, o sistema de defesa utilizado, constitutivo e/ou induzido, depende de vários aspectos da interação planta-inseto (Harborne, 1988). As defesas constitutivas são geralmente relacionadas, a total resistência de plantas ao ataque de uma determinada espécie de inseto. Já as defesas induzidas, por sua vez, têm ação diretamente envolvida na resposta ao estresse (Ryan, 2000).

Nas últimas duas décadas, as defesas diretas induzidas receberam crescente atenção sendo estudadas a nível genético, bioquímico, fisiológico e ecológico (Leon *et al.*, 2001). São caracterizadas pela síntese de proteínas, que atuam como toxinas, ou mesmo como agentes de retardamento do desenvolvimento do agressor (Ryan, 1978). Apesar desse mecanismo não estar ativo antes da agressão, e sua ativação comprometer os recursos normais da planta, as proteínas produzidas podem ser acumuladas e armazenadas. Além disso, considerando custo metabólico da produção de proteínas de defesa, esse só será necessário no caso de ataque por predadores, e ainda sim é bem menor do que o custo envolvido no mecanismo constitutivo de defesa (Baldwin, 1998; Heil e Baldwin, 2002).

1.3. AS DEFESAS DIRETAS INDUZIDAS

As defesas induzidas disparadas pela interação planta-inseto compreendem um importante mecanismo ecológico que têm sido alvo de intenso estudo, não somente pelos processos biológicos envolvidos, mas também pelo fato de que o conhecimento desses mecanismos serviria de base para o manejo biológico de pragas economicamente importantes na agricultura (Dicke *et al.*, 2004). Como resultado, hoje se sabe que as plantas respondem, ao ataque de insetos herbívoros, produzindo compostos químicos que a tornam mais resistentes a posteriores processos de herbivoria. Alguns desses compostos são similares àqueles sintetizados contra a infecção por patógenos. Contudo, desde que o ataque de herbívoros ocorre em uma escala superior à infecção causada por patógenos, a resposta contra herbívoros tende a ser ampliada de forma sistêmica (Baldwin e Preston, 1999). Isso pode ser facilmente explicado quando se toma o mecanismo de resposta hipersensível (RH). A RH é caracterizada como um evento de suicídio celular programado que impede efetivamente a dispersão de afídeos (Fernandes, 1998), no entanto não é eficaz contra herbívoros maiores. Mas, quando uma resposta em larga versão, análoga a RH, ocorre promovendo a eliminação prematura da estrutura atacada pelo herbívoro na planta (por exemplo, em folhas que estão sendo destruídas), a defesa se torna efetiva (Kahn e Cornell, 1983). Esse fascinante padrão de defesa sistêmica, no qual as proteínas de defesa induzidas são também produzidas em sítios distantes do local de ferimento, foi inicialmente

descoberto em 1972 quando Green e Ryan demonstraram o acúmulo de uma proteína de defesa em folhas de plantas de tomate e batata, feridas mecanicamente, como também em folhas adjacentes não feridas. Essas proteínas foram posteriormente analisadas e classificadas como inibidores de proteinase que inibem proteases digestivas de insetos herbívoros (Ryan, 1990). A partir de então diversos pesquisadores vêm estudando intensamente esse fenômeno. O mecanismo de defesa sistêmico implica na existência de uma rede regulatória altamente complexa capaz de gerar, transportar e interpretar os sinais produzidos na interface planta/inseto (Schilmiller e Howe, 2005).

Tornou-se claro, que a resposta de defesa é iniciada, em geral, a partir de estímulos provocados por lesões na planta que levam a produção de moléculas sinalizadoras. Essas moléculas disparam uma cascata de eventos culminando na ativação dos genes de defesa e posterior síntese de proteínas de defesa, dentre as quais podemos citar como exemplo as polifenoloxidasas e os inibidores de proteinase que interferem na digestão de proteínas de predadores (insetos herbívoros, crustáceos, nematóides e outros) (Constabel *et al.*, 1995; Ryan, 1990). As moléculas sinalizadoras podem ser transportadas localmente, por difusão através de fluidos intracelular e extracelular que permeiam a ferida ou o sítio de infecção, como também sistemicamente através do sistema vascular das plantas (Pearce *et al.*, 1991).

A primeira molécula sinalizadora descrita em planta é a sistemina. A sistemina é um polipeptídeo de 18 aminoácidos, inicialmente isolado de folhas de tomate (Pearce *et al.*, 1991), cuja mobilidade e forte atividade indutora conferiram a esta molécula o papel de sinalizador sistêmico, sendo considerada o primeiro hormônio peptídico descrito em plantas. Esse polipeptídeo é derivado de uma pré-proteína de 200 aminoácidos denominada prosistemina (McGurl *et al.*, 1992). A funcionalidade da sistemina foi demonstrada por McGurl *et al.* (1992), quando verificaram que plantas de tomate transformadas com o cDNA da prosistemina, no sentido contrário de sua orientação, sob o controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor, perdiam a capacidade de montar defesas contra o ataque de larvas de *Manduca sexta*. Além disso, essas plantas transformadas apresentavam problemas na resposta sistêmica a ferimento, acumulando apenas níveis basais de

inibidores de proteinase I e II em folhas feridas. O papel essencial da sistemina na indução de resposta de defesa em plantas foi posteriormente reforçado com a produção de plantas transgênicas de tomate que superexpressavam o transgene da prosistemina no sentido correto de sua orientação (McGurl *et al.*, 1994). Nesse trabalho foi demonstrado que as plantas transgênicas de tomate acumulavam níveis anormais de sistemina mesmo na ausência de ferimento, de maneira constitutiva. E ainda, que os níveis de inibidores de proteinase I e II, nessas plantas, era quatro vezes maior do que aqueles induzidos por ferimento verificados em plantas normais de tomate. A sistemina também tem sido descrita por estar associada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), no sítio de ferimento, que são conhecidas por terem função contra patógenos oportunistas (Orozco-Cardenas e Ryan, 1999).

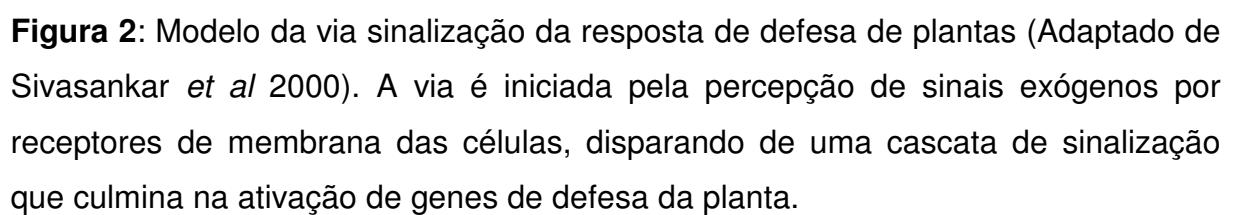
Acredita-se que a indução dos genes de defesa por sistemina seja mediada pela produção de ácidos graxos oxigenados, também chamados de oxilipinas, através da via do octadecanóide. Dessa forma a sistemina levaria a síntese de oxilipinas através da liberação de ácido linolênico, o substrato para a biosíntese do octadecanóide. Essa observação levou a Farmer e Ryan (1992) a proporem um modelo de transdução de sinal de defesa por ferimento o qual será abrangido com maior detalhes a seguir.

A descoberta de novos peptídeos sinais associados a sinalização da resposta de defesa em plantas reacendeu a necessidade de obtenção de melhores informações da interação entre planta e insetos herbívoros. Pearce e Ryan (2003) descobriram três peptídeos responsáveis por sinalizar a ativação de genes de defesa em plantas de tomate. Os três peptídeos estudados promovem a indução de inibidores de proteinase em plântulas de tomate além de levar a alcalinização de células cultivadas em suspensão. De forma similar a sistemina, os peptídeos analisados são derivados de uma única proteína precursora que é induzida local e sistemicamente. Esses dados levaram aos autores a sugerirem um novo mecanismo de ativação inicial da resposta de defesa de plantas, no qual inúmeros peptídeos sinais podem ter papéis essenciais.

1.4. A SINALIZAÇÃO DE DEFESA EM PLANTAS



No início da década de 90, Farmer e Ryan (1992) propuseram um modelo de sinalização de resposta de defesa em plantas de tomate, no qual a sistemina é uma peça chave. De acordo com modelo proposto, o ferimento em folhas de plantas de tomate resulta na liberação de sistemina a partir de seu precursor no apoplasto. A sistemina é então translocada através do sistema vascular aos tecidos alvo das plantas, onde dispara a ativação de uma lípase resultando na liberação do ácido linolênico. Através da via do octadecanóide o ácido linolênico é então convertido a ácido jasmônico (AJ) através da ação de diversas enzimas dentre as quais podemos citar as enzimas envolvidas na via das lipoxigenases, que veremos mais adiante. Com o passar dos anos, o modelo proposto por Farmer e Ryan vem sendo complementado (Fig. 2).



Hoje, a esse modelo somam-se novas informações a respeito de como ocorre a resposta de defesa de plantas. Através do uso de uma sistemina marcada radioativamente com ^{125}I , Scheer e Ryan (1999) identificaram uma proteína de 160 kDa localizada na membrana plasmática de células em suspensão de *Lycopersicon peruvianum* que atua como receptor de sistemina (recebendo o nome de *SR160*). Nesse trabalho foi demonstrado que essa proteína exibe uma interação específica e reversível com a sistemina que aumenta diversas vezes em resposta a metil jasmonato, sugerindo que o receptor possa ser induzido para amplificar o sinal de defesa.

A interação do receptor com a sistemina regula uma série de eventos intracelulares que incluem: (1) a despolarização da membrana; (2) abertura de canais iônicos; (3) aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} a inativação de ATPases na membrana plasmática; (4) a ativação de uma fosfolipase A_2 (PLA_2), responsável pela liberação de ácido linolênico das membranas (Ryan, 2000). De maneira interessante, a síntese de octadecanóides em plantas é semelhante à produção de prostaglandinas e leucotrienos a partir de ácido araquidônico, pela ação de PLA_2 em células animais. Como o ácido linolênico é o constituinte majoritário dos lipídios de plantas e seus níveis livres são muito baixos, sua conversão a ácido jasmônico pode ser regulada por lipases tais como as PLA_2 (Farmer e Ryan, 1992), especialmente pelo fato de que o ácido linolênico domina a posição *sn*-2 dos fosfolipídios de membrana, equivalente ao ácido araquidônico em animais.

Como já se sabe o AJ é o produto terminal da via do octadecanóide, sendo sintetizado em várias etapas iniciadas após a liberação do ácido linolênico da membrana plasmática. A molécula de AJ funciona como um sinalizador, juntamente com outros intermediários nessa via, e com derivados biologicamente ativos (coletivamente denominados jasmonatos), em resposta a estímulos de natureza biótica e abiótica (Devoto e Turner, 2005). Os jasmonatos tem sido freqüentemente mostrados, desde a década de 90 (Ryan, 1990) por induzirem genes de defesas em plantas levando ao aumento da resistência contra predadores e patógenos (Doares *et al.*, 1995; McConn *et al.*, 1997; Thomma *et al.*, 1999; Kloeck *et al.*, 2001; Schaller *et al.*, 2005). Os jasmonatos fazem parte de um grupo de moléculas biologicamente



ativas, denominadas oxilipinas, que são produzidas pela ação coordenada de lípases, lipoxigenases (LOX) e citocromos P450 que são especializados no metabolismo de hidroperóxidos de ácidos graxos. Essas oxilipinas tem sido estudadas por exercem várias funções na planta em resposta a ferimento (revisado por Howe e Schilmiller, 2002).

A BIOSÍNTESE DE OXILIPINAS E SUAS FUNÇÕES NO MECANISMO DE DEFESA

As oxilipinas são metabólicos produzidos pela oxidação de ácidos graxos insaturados através de várias vias metabólicas divergentes. Em animais, as oxilipinas são sintetizadas principalmente a partir da via de oxidação do ácido araquidônico (20:0), tendo majoritário papel nos processos inflamatórios. Acredita-se que fito-oxilipinas são produzidas em plantas a partir da oxidação do ácido linolênico (18:3) através da via das lipoxigenases (Fig. 3) e que possuem papel primordial nas respostas de defesa de plantas. As LOX são enzimas que catalizam a adição de oxigênio molecular à ácidos graxos poliinsaturados, convertendo-em hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados. Nas plantas, as LOX atuam diretamente sobre os ácidos linoleico e linolênico (C18:3) ocasionando a produção de 9 ou 13-ácido hidroxiperoxiocetadecadi(tri)enóico (9 ou 13-HPOT), desempenhando, dessa forma, papéis importantes no desenvolvimento, maturação e senescência (revisado por Siedow, 1991). A indução sistêmica de LOX em folhas de plantas feridas tem sido observada em diversas espécies de plantas após herbivoria e ferimento mecânico (Farmer e Ryan, 1992; Porta e Rocha-Sosa, 2002, Rangel *et al.*, 2002). O papel da enzima no mecanismo de defesa contra ferimento parece estar associado ao seu envolvimento na biossíntese de oxilipinas como: o ácido jasmônico e o ácido 12-oxo- fitodienoico (OPDA) (Creelman e Mullet, 1997; Vick e Zimmerman, 1987). Nos últimos anos, o conhecimento das funções das LOX e oxilipinas em plantas tem aumentado graças às contribuições de inúmeros grupos de pesquisa. Além disso, o número cada vez maior de seqüência de LOX descritas, permite a análise de seus relações filogenéticas e a descoberta de dados importantes sobre sua atividade e especificidade (Porta e Rocha-Sosa, 2002).

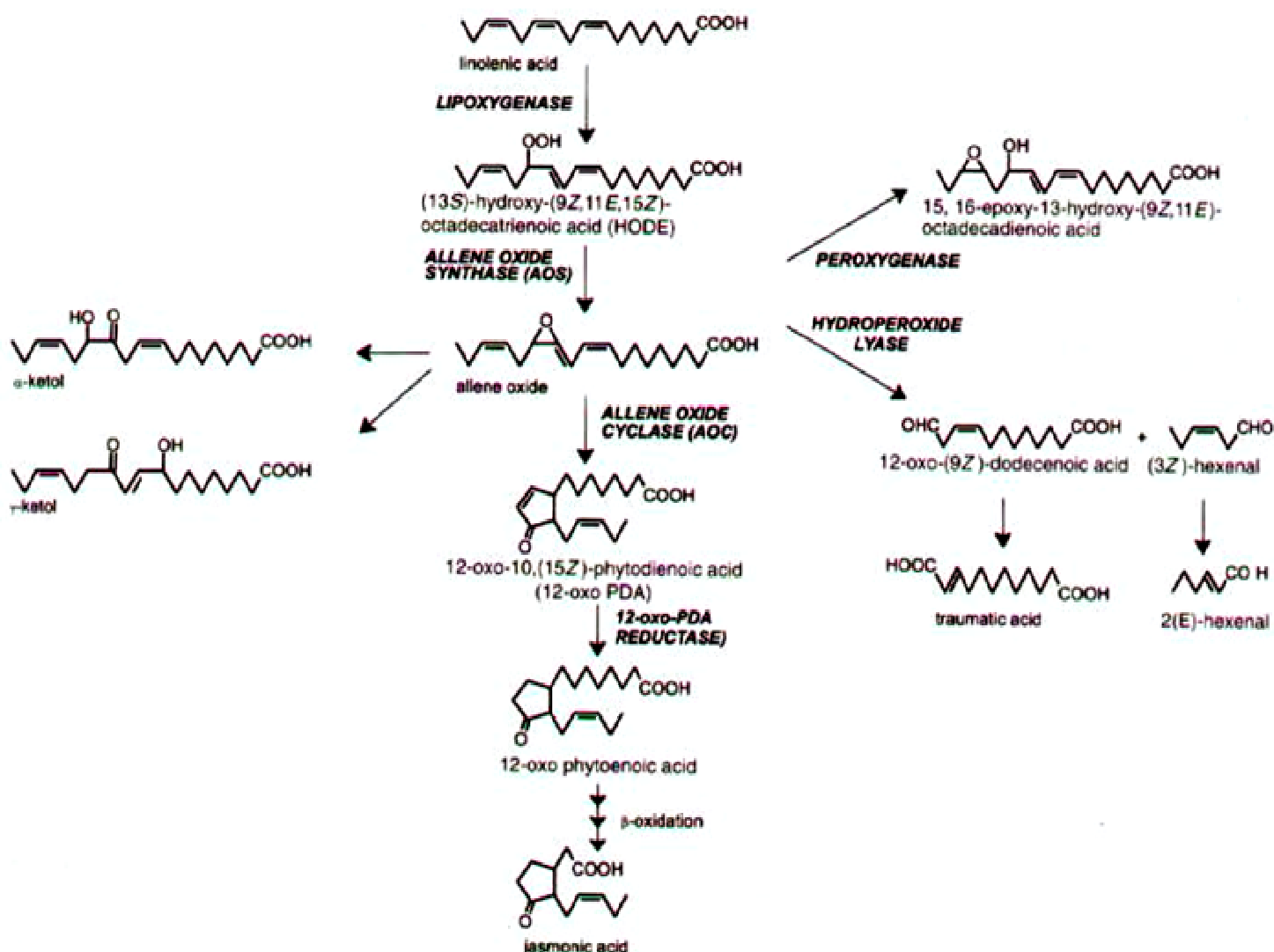


Figura 3: Modelo da via das lipoxigenases compreendendo a biosíntese do ácido jasmônico (Adaptado de Wasternack *et al.*, 1998)

As LOX são descritas por se acumularem em vários compartimentos celulares tais como: no estroma de cloroplastos (Feussner e Kindl, 1994; Rangel *et al.*, 2002), vacúolos (Tranbarger *et al.*, 1991) e mitocôndrias (Braidot *et al.*, 1993). Heitz *et al.* (1997) demonstraram que uma LOX, induzida por fermento,

supostamente envolvida na catálise da primeira etapa da biossíntese de jasmonatos é direcionada para os cloroplastos. Em *Arabidopsis* e batata, tem sido demonstrado que as isoformas de LOX (*At*LOX2 e H3, respectivamente) envolvidas no mecanismo de defesa também são localizadas nos cloroplastos. A redução dos níveis dessas isoformas, em plantas transgênicas, causa uma conseqüente diminuição no acúmulo de transcritos induzidos por ferimento nessas plantas (Bell *et al.*, 1995; Royo *et al.*, 1999). Essa idéia foi reforçada por Conconi *et al.* (1996) que observaram a redução de diacilgliceróis nos cloroplastos, de folhas de plantas de tomate, após ferimento mecânico levando ao conseqüente aumento nos níveis de ácido linolênico, substrato da biossíntese de oxilipinas. Postula-se então que as LOX encontradas em cloroplastos estão diretamente envolvidas no mecanismo de defesa de plantas em resposta a ferimento e tratamento com metil jasmonato (Bell *et al.*, 1995; Rangel *et al.*, 2002).

Um significativo avanço no entendimento sobre a biossíntese das oxilipinas está relacionado a descoberta das enzimas da via das lipoxigenases: a Aleno oxido sintase (AOS), a Hidroperoxi Liase (HPL) e a divinil ester sintase (DES), as quais são membros da família de citocromos 450, chamada de CYP74 (Song *et al.*, 1993; Itoh e Howe, 2001). Dentre essas enzimas, a enzima AOS se destaca por ser uma enzima responsável pela conversão de hidroperóxidos, resultantes da atividade de LOX, em aleno óxidos instáveis que são precursores de AJ. Posteriormente, os aleno óxidos são processados pela enzima aleno oxido ciclase (AOC), ainda nos cloroplastos, levando a produção do composto ácido 12-oxo-fitodienólico (OPDA), precursor direto da molécula de AJ. As moléculas de OPDA produzidas são exportadas para os peroxissomos, onde são convertidas à AJ pela ação da enzima ácido 12-oxo-fitodienólico redutase, seguida processos de β -oxidação (Wasternack *et al.*, 2006).

Recentes estudos mostram que a diversidade estrutural e funcional entre as oxilipinas depende da expressão coordenada de isoformas específicas de LOX e de enzimas da família de citocromos P450, uma vez que isoformas diferentes das enzimas envolvidas podem levar a produção de oxilipinas distintas envolvidas em vários processos metabólicos (revisado por Howe e Schilmiller, 2002). Além disso, tem sido demonstrado que as plantas contêm um conjunto distinto de oxilipinas de

vários tamanhos, constituindo uma “identidade de oxilipinas” de uma determinada organela, tecido, planta ou espécie (Weber *et al.*, 1997). Desta forma, sob condições de estresse, as plantas promovem uma drástica mudança na composição dos derivados de ácidos graxos oxigenados, dependendo da natureza desse estresse. Pode-se citar como exemplo, a produção de derivados de ácidos graxos hidroxí em folhas de cevada após indução com ácido salicílico (Weichert *et al.*, 1999), enquanto que a indução por metil jasmonato leva ao acúmulo de aldeídos nas mesmas plantas (Kohlmann *et al.*, 1999).

Algumas oxilipinas são bastante estudadas pelo seu papel nos mecanismos de defesa de plantas. Entre elas estão os compostos 12-OPDA, que são os precursores de moléculas sinalizadoras tais como o AJ; o ácido 12-oxo-*trans*-9-dodecenóico que é precursor de um hormônio vegetal de ferimento chamado traumatina; e ainda outras oxilipinas que são convertidas em compostos que estão envolvidos na resposta de plantas a agressores por serem monômeros de cutina ou fitoalexinas (pesticidas naturais) (Creelman e Mullet, 1997; Blée, 1998; Porta e Rocha-Sosa, 2002). O AJ e seu metil ester, MJ, tem recebido atenção especial, por possuir um papel fundamental na regulação da expressão gênica ativada por ferimento, no mecanismo de defesa de plantas (Creelman e Mullet, 1997; Schaller, 2001). Já é bem estabelecido que, quando aplicado em plantas, o AJ e seus derivados, incluindo o MJ desempenha um papel crítico na sinalização de ferimento dependente de AJ (Howe, 2004). Tem sido proposto que a enzima ácido jasmonico metil transferase, que converte AJ a MJ tem apresenta importante papel no mecanismo de defesa (Seo *et al.*, 2001) levando a considerações importantes sobre a molécula de metil jasmonato, que aparentemente funciona como um transdutor de sinal intracelular.

Curiosamente, em adição ao processo de ativação da biossíntese de AJ por ferimento e herbivoria, estudos demonstram que as enzimas responsáveis pela produção dos jasmonatos têm seus níveis aumentados tanto em condições de ferimento, quanto no tratamento com a aplicação de AJ exógeno, sugerindo um importante mecanismo de retroalimentação positiva que levaria a altos níveis de jasmonatos em plantas danificadas (Leon *et al.*, 2001, Howe *et al.*, 2000; Sivasankar *et al.*, 2000; Rangel *et al.*, 2002). Em razão disso, pesquisas vêm propiciando um

número crescente de informações sobre as respostas induzidas por jasmonatos em plantas, e mais recentemente tenta-se elucidar a via biossintética do ácido jasmônico, principalmente em dicotiledôneas (Schaller, 2001).

A regulação da biossíntese de AJ por geração de substratos é explicada pela atividade das enzimas iniciais da via do octadecanóide, dessa forma uma melhor compreensão de como a planta regula a produção de moléculas defensivas e a resposta de defesa tem sido obtida com a clonagem e caracterização de cDNA codificante de enzimas críticas na via de biossíntese dos jasmonatos, principalmente a AOS, que cataliza a primeira reação específica da síntese de ácido jasmônico em dicotiledôneas (Song *et al.*, 1993; Laudert *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 2000) e monocotiledôneas (Maucher *et al.*, 2000).

A ALENO OXIDO SINTASE

A AOS, também chamada de hidroperóxido desidratase (EC 4.2.1.92), é uma enzima responsável pela isomerização de hidroxiperóxidos de ácidos graxos, convertendo-os em aleno óxidos intermediários (revisado por Schaller, 2001). Em plantas, a AOS juntamente com a HPL e a DES compreendem um grupo atípico CYP74 da família de citocromos P450, que é especializada no processo de rearranjo de hidroxiperóxidos. Ao contrário das enzimas citocromos P450 típicas, as enzimas CYP74 possuem baixa afinidade por CO e não requerem O₂ ou equivalentes redutores de NADPH para sua atividade máxima.

A enzima AOS foi inicialmente purificada de sementes de linho (Song e Brash, 1991; Song *et al.*, 1993). Anos mais tarde, outras AOS foram purificadas de diversas plantas: guaiúle (Pan *et al.*, 1995), *Arabidopsis thaliana* (Laudert *et al.*, 1996), tomate (Sivasankar *et al.*, 2000), milho (Utsunomiya *et al.*, 2000) e batata (Hamberg, 2000). A atividade de AOS tem sido detectada em cloroplastos de folhas de espinafre (Vick e Zimmermann, 1987), cevada, (Maucher *et al.*, 2000), tomate (Froehlich *et al.*, 2001) e batata (Farmaki *et al.*, 2007). Em concomitância a esses dados, a análise da seqüência de cDNA de linho (Song *et al.*, 1993), tomate (Sivankasar *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2000) e *A. thaliana* (Laudert *et al.*, 1996) demonstram que todos possuem seqüências peptídicas sinalizadoras de

direcionamento para cloroplastos. No entanto essas seqüências não foram encontradas nas AOS de guaiúle (Pan *et al.*, 1995) e nas duas isoformas de AOS de cevada (Maucher *et al.*, 2000).

Ainda é limitado o conhecimento sobre os papéis fisiológicos da AOS. O passo inicial para o entendimento da atividade de AOS foi dado por Vick e Zimmerman (1987) e Song e Brash (1991) que purificaram uma AOS de sementes de linho, e a indentificaram como uma enzima da família de citocromos P450 responsável pela formação de aleno óxidos instáveis. Posteriormente, foi observada a produção da mesma enzima em partículas de borracha em plantas de guaiúle, mostrando que a AOS era responsável pela catálise da conversão de 13(S)-hidroperóxidos ao correspondente ácido graxo cetol (Pan *et al.*, 1995), conhecido como um aleno óxido. Hoje, tem-se mostrado que os aleno óxidos produzidos pela ação da AOS podem sofrer processos de ciclização espontânea como também podem ser ciclizados pela ação de uma outra enzima, a aleno oxido ciclase (AOC), para formar ácidos ciclopentenóicos (Hamberg *et al.*, 1988; Hamberg *et al.*, 1990).

Sabe-se que o composto 13(S)-hydroperoxide-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatrienoic acid (13-HPOT), produzidos a partir do ácido linolênico pela ação de LOX é convertido pela AOS para precursores de jasmonatos, como o ácido oxofitodienóico (12-OPDA) (Song e Brash, 1991; Pan *et al.*, 1995). Os jasmonatos por sua vez, são sinalizadores essenciais para a defesa de plantas contra o ataque de insetos, ferimentos mecânicos e alguns outros processos metabólicos. Devido a esse fato, a AOS tem recebido crescente atenção por ser um ponto crítico para a regulação da produção de AJ, uma vez que compromete a utilização dos 13-HPOT por outras enzimas como a HPL, a DES e a peroxigenase (Fig. 3), direcionando a cascata de sinalização para o sentido da produção dos compostos de defesa dependentes de jasmonatos. Dessa forma, a clonagem molecular e a superexpressão do gene de AOS em plantas tem sido utilizada como artifício para demonstrar o importante papel da AOS na via de sinalização de defesa de plantas. Inicialmente, Laudert *et al.* (1996) clonaram e superexpressaram o gene da AOS de *A. thaliana* demonstrando que a expressão do gene é aumentada em condições de ferimento. Essa expressão levava ao aumento da atividade catalítica da enzima AOS que metaboliza 13-hidroperóxidos e, conseqüentemente, ao acúmulo posterior

de AJ nas folhas da planta. Em adição, em *A. thaliana* ainda foi sugerida a indução de AOS por etileno, o que levou a indicação de que os dois fito-hormônios atuam de maneira similar (Laudert e Weiler, 1998).

Harms *et al.* (1995) introduziram o cDNA total de AOS de linho em plantas de batata sob a regulação do promotor 35S do vírus do mosaico de couve-flor. A superexpressão de AOS nesse caso, levou ao aumento de 6 a 12 vezes nos níveis endógenos de AJ em relação às plantas controle. O mesmo grupo, estudando a inibição da indução do acúmulo de AOS pelo composto aspirina em plantas de linho, verificou um aumento da expressão sistêmica do gene codificante de AOS em resposta a ferimento mecânico, tratamento com AJ e seu precursor, o 12-OPDA em folhas de linho, na ausência do composto. O aumento dessa expressão foi descrito por provocar, conseqüentemente, um acréscimo nos níveis endógenos de AJ nas células (Harms *et al.*, 1998). Contudo, a adição de aspirina nas folhas leva ao bloqueio da expressão do gene AOS. Esse bloqueio explicaria a redução do acúmulo de AJ em folhas de linho, previamente descrita por Peña-Cortéz *et al.* (1993). Esses dados levaram os autores a sugerirem a importância da produção de AOS na sinalização da resposta de defesa contra o ataque de insetos herbívoros.

O papel da AOS na defesa de plantas, tem sido demonstrada também em plantas de tabaco e tomate. Wang *et al.* (1999) produziram plantas de tabaco transgênicas superexpressando o transgene da AOS de linho sob o controle de um promotor induzido por tetraciclina. Essas plantas quando submetidas a ferimento, tinham seus níveis de AJ aumentados cerca de 2,5 a 5 vezes mais do que as plantas não transformadas. Um ano mais tarde, Sivasankar *et al.* (2000) analisaram a indução da expressão do gene de AOS, em plântulas de tomate, em resposta a ferimento, e tratamento com sistemina, metil jasmonato e ácido fitodienólico (PDA). As análises mostraram que todos os tratamentos levaram a transcrição de RNA mensageiro de AOS assim como de inibidores de proteinase serínicos (PIN II), os quais são bem conhecidos por serem caracterizados como evento final na cascata de sinalização de resposta de defesa induzida por ferimento e tratamento com metil jasmonato.

Recentemente, nosso grupo purificou e caracterizou parcialmente uma lipoxigenase de folhas de plantas de maracujá (*Passiflora flavicarpa*) induzida em

resposta a metil jasmonato. Durante esse estudo, foi verificado que a enzima estava presente em cloroplastos tendo atividade de 13-lipoxigenase, que é descrita por ser a responsável pela produção de 13-HPOT, substrato inicial da biossíntese de AJ (Rangel *et al.*, 2002), o que nos levaria, posteriormente, a suposição da metabolização desse composto por uma AOS produzida nas plantas de maracujá.

1.5. O MARACUJÁ

O maracujá é uma fruta nova que se tem tornado popular entre muitos agricultores ao redor do mundo nos últimos anos. Pertencente a família Passifloraceae, o maracujazeiro é classificado como uma planta do gênero *passiflora*, que é composto de 24 subgêneros e 465 espécies. Dentre essas, pelo menos, 200 espécies de maracujá, são originárias do Brasil, das quais apenas 70 são consideradas como frutos comestíveis. De maneira interessante, apesar da variedade de espécies encontradas no país, apenas algumas dessas espécies são realmente cultivadas, como por exemplo: *P. edulis Sims f. Flavicarpa*, *P. alata Curtis*, *P. quadrangularis L.*, *P. caerulea L.* e *P. laurifolia L.* (Cunha *et al.*, 2004).

A espécie *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* (*Passiflora flavicarpa*), largamente conhecida no Brasil como maracujá amarelo, tem grande importância econômica para o país. Desde a década de 90, o cultivo de maracujá sofreu um aumento de produtividade e na área de cultivo nos Estados de Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Ceará e Alagoas. Durante anos, o Brasil se encontrou em situação de destaque, exportando frutos frescos, conservados e ainda suco concentrado, que representa a forma mais importante de exportação. Porém, devido a deficiências no processo de comercialização, a exportação reduziu e o país passou a importar frutos de outros países como Equador e Colômbia. Somente o Estado do Espírito Santo manteve a posição de destaque nas exportações, uma vez que ampliou na mesma época o cultivo da espécie, tornando-se um produtor com grande potencial de exportação da fruta (Pires *et al.*, 2004). Uma das causas destas variações entre regiões produtoras e oferta, está relacionada as técnicas de cultivo. Esse problema surge da interação entre a degeneração da “variedade local” e o aumento significativo da incidência de pragas e doenças que resulta na perda de

classificação, diminuição da produtividade e o conseqüente aumento dos custos de produção. Aliado a isso, apesar dos esforços empreendidos, os profissionais de assistência técnica tem se frustrado, pois o atual nível de conhecimento tecnológico não tem sido suficiente para reverter essa situação (http://www.maracuja.com.br/body_cultivo.htm).

Diversas espécies de insetos se encontram associadas ao cultivo de maracujazeiro. A grande maioria desses insetos é oportunista e passageira. Entretanto algumas outras espécies pragas, durante seu ataque, causam a diminuição da produção devido a destruição de tecidos vegetais. Dentre essas pragas de destacam as lagartas, representadas pelas espécies, *Dione junio junio* e *Agralis vanillae vanillae* que promovem a destruição de tecido foliar por herbivoria, sendo conhecidas vulgarmente como lagartas desfolhadoras do maracujazeiro (revisado por Cunha *et al.*, 2004). Além de lagartas, o maracujazeiro também é alvo de afídios, que podem causar danos à produção pelo fato de que levam a transmissão de doenças virais que são gravíssimas em algumas regiões (Hill e Waller, 1994).

Devido a sua importância econômica para o país, nosso grupo de pesquisa escolheu o maracujazeiro como modelo de estudo do mecanismo de defesa das plantas contra ferimento e tratamento com moléculas eliciadoras de resposta de defesa, como o MJ. Apesar do limitado conhecimento sobre as estratégias de defesas químicas utilizadas por essa espécie, Rangel *et al.* (2002) inicialmente, observaram que após o ferimento mecânico provocado em tecidos foliares de plântulas de maracujá, verificava-se a indução da produção de LOX, que como descrita anteriormente, é a primeira enzima da rota do octadecanoide, envolvida no mecanismo de defesa de várias espécies de plantas. Em adição, no mesmo trabalho, foi descrita uma indução ainda maior quando as plântulas tinham suas folhas expostas a vapores de MJ, indicando que o mecanismo de defesa de plantas de maracujá é similar ao mecanismo descrito para outras espécies.

O trabalho desenvolvido por Rangel *et al.* (2002), serviu então como base para o desenvolvimento de uma estratégia de estudo adicional sobre o mecanismo de defesa de plantas de maracujá visando a obtenção de informação sobre outras enzimas envolvidas na rota do octadecanóide, como é o caso da AOS, que



desempenha um papel chave no direcionamento da rota para a produção de proteínas de defesa contra herbivoria. Esses estudos têm significativa importância econômica, uma vez que permitiriam a melhoria das condições de cultivo de maracujá, principalmente em relação ao aumento da resistência dessas plantas ao ataque de pestes e pragas, sendo de grande valia para a economia Brasileira.



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de um gene codificador de uma enzima AOS em cloroplastos de células do tecido foliar de maracujá (*Passiflora edulis* Sims *flavicarpa flavicarpa*) em resposta a ferimento mecânico e tratamento com metil jasmonato .

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clonar o cDNA completo da AOS;
2. Analisar a expressão gênica de AOS em resposta a ferimento mecânico, tratamento com MJ;
3. Analisa a quantidade de cópias do gene AOS no genoma do maracujá;
4. Determinar a localização da enzima AOS induzida por tratamento com MJ em células foliares de maracujá;
5. Analisar a indução de inibidores de proteinase cisteínica em folhas de maracujá em resposta a ferimento mecânico e tratamento com MJ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. SEMENTES DE MARACUJÁ

As sementes de maracujá (*Passiflora flavicarpa*), foram obtidas de frutas comercializados no mercado local. As sementes foram extraídas dos frutos e mantidas em estufa à 37 °C para secagem.

3.1.2. PLANTAS DE MARACUJÁ E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Sementes secas de maracujá foram plantadas em vermiculita, por um período de 2 semanas sob condições normais de luz a 60 mE m⁻² s⁻¹ e um fotoperíodo de 17 h luz a 28 °C e 7h escuro a 18 °C. Após a germinação das sementes as plântulas foram transferidas para vasos contendo em humos de minhoca e crescidas em câmaras de crescimento por cerca de mais 20 dias nas mesmas condições descritas acima.

3.1.2. BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Bactérias competentes *E. coli* - Top 10 (One Shot[®] competent cells, que compõem o kit TOPO TA Cloning[®] – Invitrogen), foram mantidas a -70 °C, conforme especificações do fabricante.

3.1.4. ANTICORPOS

Os anticorpos policlonais produzidos contra a AOS de tomates foram cedidos gentilmente pelo pesquisador Dr. Greg A. Howe (da Universidade DO Estdo de Michigan). Esses anticorpos foram mantidos a uma temperatura de -20 °C para preservação da atividade biológica. Os anticorpos policlonais contra a cistatina do tomate foram produzidos por Madureira *et al.* (2006) e mantidos nas mesmas condições descritas acima.

3.2. ANÁLISE DE UMA PROTEÍNA IMUNO RELACIONADA A AOS DE TOMATE POR DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA, SDS-PAGE E “WESTERN BLOT”

3.2.1. TRATAMENTO DE PLANTAS DE MARACUJÁ POR EXPOSIÇÃO A VAPORES DE METIL JASMONATO

Plantas de maracujá, após um período de 20 dias de crescimento, tiveram suas folhas expostas a vapor de MJ baseando-se em metodologia descrita por Farmer e Ryan (1992). Para essa finalidade, as plantas foram colocadas em recipientes hermeticamente fechados contendo um cotonete embebido com 2 μ L de MJ e mantidas por um período de 24 h nessa condição. Ao fim do tratamento, as folhas das plantas tratadas e de plantas controle (não expostas a vapor de MJ) foram coletadas separadamente e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido.

3.2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO FOLIAR

O processo de extração de proteínas de tecido foliar de plantas de maracujá foi baseado na metodologia descrita por Rangel *et al* (2002). As folhas congeladas em nitrogênio líquido foram maceradas em um almofariz com auxílio de um pistilo. O material macerado foi ressuspenso e mantido em tampão de extração Fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,5) a 4 °C por 15 min. Após esse intervalo, o material foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C por 30 min e o sobrenadante originado foi analisado por SDS-PAGE e ensaios de imunodeteção.

3.2.3. DOSAGEM DO TEOR PROTÉICO

Para este experimento foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). A curva padrão foi feita utilizando-se “Albumina Sérica Bovina” (BSA) de acordo com instruções do kit “Bio-Rad Protein Assay”®. A montagem da curva-padrão foi feita confeccionando-se um gráfico de absorbância a 595nm versus μ g de proteína. A dosagem da amostra foi feita conforme instruções de microensaio do Kit.

3.2.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE METABOLIZADORA DE 13-HIDROPERÓXIDOS PELAS ENZIMAS CONTIDAS NO EXTRATO BRUTO FOLIAR DE PLANTAS DE MARACUJÁ

3.2.4.1. PREPARO DE HIDROPERÓXIDOS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O 13-hidroperóxidos (13 HPOT) de ácido linolênico usados como substrato nos ensaios de atividade da enzima AOS foram preparados através da utilização de uma lipoxigenase semi purificada do tecido foliar de plantas de maracujá (Rangel *et al.*, 2002). Para este fim, 50 μ L de frações de G-200 contendo a lipoxigenase semipurificada, a partir de plantas tratadas com MJ, foram adicionados a um tubo contendo 10 mL de tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 a temperatura ambiente. Em seguida, 400 μ L de ácido linolênico 10mM foram adicionados à reação que foi mantida em incubação por pelo menos 45 min. Ao fim desse intervalo, a solução contendo os 13-HPOT resultantes do processo, foram então armazenada para utilização nos ensaios de atividade.

3.2.4.2. ENSAIO DE ATIVIDADE METABOLIZADORA DE HIDROPERÓXIDOS

A atividade da proteína metabolizadora de 13-HPOT, foi ensaiada por uma técnica de espectrofotometria descrita anteriormente por Vick (1991), para detecção de atividade de proteínas AOS. A mistura de reação continha a solução de 13-HPOT adicionados a tampão 50 mM Tris-HCl (pH8.0) em um volume total de 1 mL e absorvância inicial de 0,400. A reação enzimática foi iniciada pela adição de extrato bruto foliar (70 μ g) e a redução de absorvância a 234 nm, resultante do rompimento da ligação dieno do substrato, foi continuamente monitorada a temperatura ambiente por 3 min, com um espectrofotômetro (Shymadizu UV 1203).

3.2.5. ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10% (SDS-PAGE)

Oitenta microgramas de proteínas contidas no extrato bruto foram analisadas em géis de poliacrilamida 10% conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). Para este fim, o extrato protéico foliar de plantas maracujá controle e tratadas com MJ, foram pré-incubadas em tampão de desnaturação e em seguida fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a uma voltagem constante de 100 V por aproximadamente 45 min.

3.2.5.1. COLORAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DO GEL POR AZUL DE COOMASSIE

Após o processo de eletroforese, o gel foi mergulhado em solução contendo azul de Coomassie R250 0,2% em metanol 45%, ácido acético 10% por 30 min. Após esse período o gel foi transferido para uma solução aquosa de descorante contendo metanol 5% e ácido acético 7%.

3.2.5.2. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS FIXADAS EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE

Os ensaios de imunodeteccção (*“western blot”*) foram feitos conforme metodologia descrita por Towbin *et al.*, (1979). As proteínas fracionadas em gel de poliacrilamida foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose por 2 h a 10 V em tampão 0,05 M fosfato de sódio pH 7,4. Anticorpos policlonais produzidos contra AOS de tomate e o soro pré imune, produzido em coelho, foram usados em uma diluição de 1:3.000. A banda imunoreativa foi visualizada usando proteína A conjugada a peroxidase (1 mg.mL^{-1}) em uma diluição de 1:1.000. Para a detecção das proteínas imunorreativas foi utilizado o kit de detecção por quimioluminiscencia, “Amersham ECL reagent[®]” de acordo com as instruções do fabricante.

3.3. CLONAGEM MOLECULAR DO cDNA DE UMA AOS DE FOLHAS DE MARACUJÁ

3.3.1. CLONAGEM MOLECULAR DO FRAGMENTO CORRESPONDENTE A REGIÃO CENTRAL (CORE) DA AOS

3.3.1.1. DESENHO DE INICIADORES DEGENERADOS PARA A OBTENÇÃO DE UM FRAGMENTO (CORE) DA AOS

Com base na análise, feitas no BLAST, das seqüências de aminoácidos conservadas de AOS de plantas, foram desenhados iniciadores degenerados para a obtenção de um fragmento de cDNA de aproximadamente 950 pb. As seqüências de aminoácidos para os iniciadores foram as seguintes: na posição “Foward”, **FTGTFVP** e na posição “Reverse”, **WSNGP**. Procedendo-se a conversão desses aminoácidos para a correspondente seqüência em nucleotídeos, bem como as substituições de bases U (uracila) por T (timina), chegamos às seguintes seqüências: “Foward” → 5’ TTC AC(CT) GG(AT) ACT T(AT)C (AG)TG CC 3’ (DgAOS-F); “Reverse” → 5’ TCC GG(CT) CC(AG) TT(AC) GAC CA(CT) 3’ (DgAOS-R) (Esquema 1). Os parênteses marcam posições em que esse local podem conter 50% de uma ou da outra base indicada nos iniciadores. Os iniciadores foram sintetizados e adquiridos da Invitrogen.

3.3.1.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE FOLHAS DE MARACUJÁ

Tecido foliar das plantas de maracujá tratadas com MJ por 12 h, foi congelado em nitrogênio líquido e macerado com a utilização de um almofariz e pistilo. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol® (GIBCO) seguindo-se basicamente as instruções do fabricante (com algumas alterações). Resumidamente, aos tubos contendo 1 mL de TRIzol® foi adicionado macerado foliar até a proporção de 10% do volume de TRIzol utilizado. O material foi mantido em incubação, sob agitação, por 3 min a 25 °C, e em seguida, centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de clorofórmio e o material foi novamente mantido em agitação por 5 min a 25 °C. e centrifugado a

12.000 x g por 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde, em seguida, foi sedimentada com a adição de 500 µL de isopropanol. O material foi novamente centrifugado conforme descrito acima e o sedimentado foi lavado em 1 mL de etanol 75 % (v/v). Seguindo esse passo, o sedimentado foi ressuspenso com 200 µL de água livre de RNase e DNase e incubado a uma temperatura de 60 °C por 10 min. A concentração de RNA foi estimada por leitura de absorvância a 260 nm, e em seguida a integridade das moléculas de RNA obtidas foi analisada por fracionamento em gel de agarose 1,2%.

3.3.1.3. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE RNA TOTAIS

Géis de agarose 1,2% foram preparados pela mistura de 1,2 g de agarose (Invitrogen) com 100 mL de tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM e água-DEPC). A agarose foi fundida a 100 °C, evitando-se, no entanto, o processo de fervura. Solução foi resfriada a 50 °C e a ela foi adicionado brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). A solução foi homogeneizada e vertida sobre uma placa preparada para o processo de eletroforese, em seguida mantida a temperatura ambiente preconizando a solidificação do gel. As amostras de RNA total foram preparadas misturando-se 2 µL de RNA, 4 µL de água-DEPC e 2 µL de tampão de amostra 4x (glicerol 50%, TAE 4x e azul de bromofenol 0,025%). As amostras foram homogeneizadas e aplicada no gel solidificado. O fracionamento foi feito a uma voltagem constante de 40 V. No processo de fracionamento foi utilizado o marcado de peso molecular “1 KB plus DNA ladder” (Invitrogen).

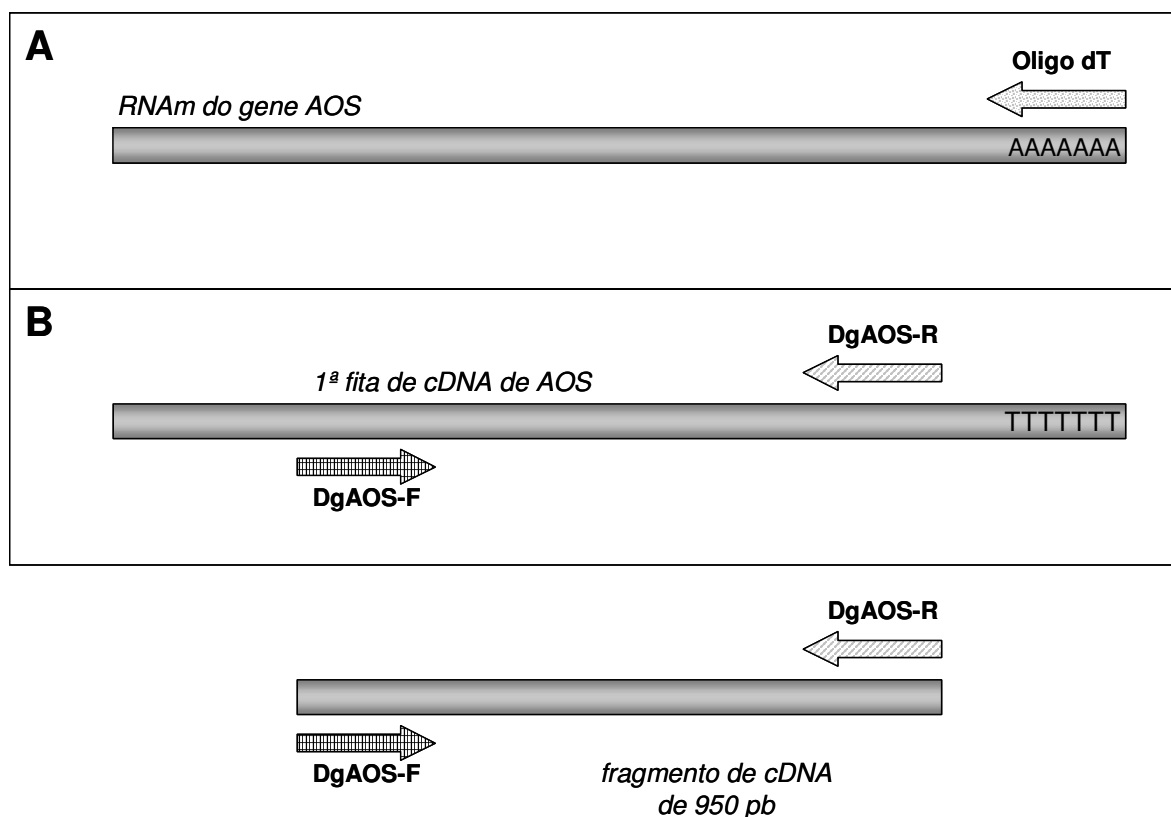
3.3.1.4. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA PARCIAL DA AOS DE MARACUJÁ POR REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT)

As reações de RT foram realizadas para a produção de uma fita de cDNA complementar a partir das fitas de RNA total de plantas de maracujá expostas a vapores de MJ por 12 h. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o Kit “ThermoScript RT-PCR systems”[®], baseando-se nas especificações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados em um tubo de microcentrifuga, os seguintes componentes: 4 µL de água-DEPC, 1 µL de iniciador oligo (dT)₂₀ (100 pmol), 2 µL de

mistura de DNTPs 10 mM (0,8 mM) e 5 μL de RNA total (5 μg). A solução foi aquecida a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, priorizando a denaturação do RNA. Em seguida, foi homogeneizada com a ajuda de uma ponteira e submetida a breve pulso de centrifugação e armazenada em gelo. A esse tubo foi adicionada 8 μL de uma segunda mistura de reação contendo: 5 μL de 5x “first-strand buffer” (250 mM Tris-acetato (pH 8,4), 375 mM acetato de potássio, 40 mM acetato de magnésio) (1x); 1 μL de DTT 100 mM (4 mM); 1 μL de RNase OUTTM 40 u. μL^{-1} (40 u); 1 μL de água-DEPC; 1 μL de enzima ThermoScript transcriptase reversa (Invitrogen) (375 u). O tubo foi pré aquecido a 55 $^{\circ}\text{C}$ por 60 min, seguidos de incubação a 85 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min no termociclador “Primus 96 Plus”. Após a síntese da primeira fita no termociclador, foi adicionado ao tubo 1 μL de RNase H 2 u. μL^{-1} (1 u) que foi incubado a 35 $^{\circ}\text{C}$ por mais 2 min. Entre parênteses foram mencionadas as concentrações finais de cada reagente.

3.3.1.5. AMPLIFICAÇÃO DA SEGUNDA FITA DE cDNA PARCIAL DA AOS DE MARACUJÁ POR PCR

A síntese da segunda fita de cDNA foi feita com a utilização da enzima “PlatinumTM Taq DNA polymerase high fidelity” utilizando, como molécula molde, a fita de cDNA obtida no processo de RT (Esquema 1-B). A reação de PCR foi feita no termociclador “Primus 96 Plus”. A mistura de reação foi montada do seguinte modo: 37 μL de água; 5 μL de tampão da enzima Platinum Taq 10 x (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) (1 x); 2 μL de MgCl_2 50 mM (2 mM); 2 μL de DNTP 10 mM (0,4 mM); 1 μL de iniciador DgAOS-F 10 pmol. μL^{-1} (10 pmol); 1 μL de iniciador DgAOS-R 10 pmol. μL^{-1} (10 pmol); 1 μL do produto de RT (1ª fita de cDNA); 1 μL da enzima Platinum Taq DNA polimerase 1 u. μL^{-1} (1 u). A solução com volume total de 50 μL foi dividida em dois tubos de PCR contendo 25 μL cada. Esses tubos foram colocados no termociclador para a reação de PCR que foi feita com 40 ciclos de denaturação a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, anelamento dos iniciadores a 45 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min e polimerização a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min.

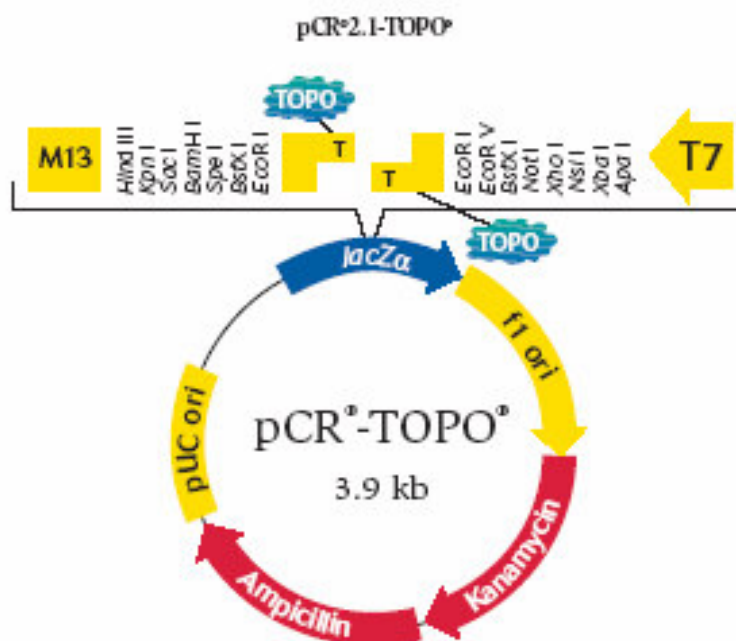


Esquema 1: Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a obtenção do fragmento de 950 pb do cDNA da AOS de maracujá. **A)** Síntese da primeira fita de cDNA partindo da amplificação por RT-PCR com os iniciadores oligo dT e DgAOSF. **B)** Síntese da segunda fita de cDNA por PCR com os iniciadores degenerados DgAOS-F e DgAOS-R. O esquema foi feito mostrando-se a representação em fita simples para a simplificação.

3.3.1.6. ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO DE CDNA DA AOS DE MARACUJÁ

As amostras amplificadas foram analisadas por fracionamento em gel de agarose 1,2 %. O fragmento produzido através da reação de PCR (item 3.3.1.5) foi ligado em um vetor pCR[®] 2.1 – TOPO[®] (Esquema 2) fornecido como parte do Kit TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen). A clonagem do fragmento nesse vetor foi feita seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a reação de clonagem (6 µL) foi feita com os seguintes componentes: 3 µL do fragmento amplificado por PCR (300 ng); 1 µL de solução salina NaCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, 1 µL do vetor TOPO[®] (10 ng), 1 µL de água ultra pura. A mistura de reação foi homogeneizada suavemente com o auxílio de uma ponteira e mantido por 5 min a 25 °C. Após esse intervalo, a reação foi transferida para banho de gelo (4 °C).

Com a finalidade de transformar bactérias competentes *Top 10* (One Shot[®] competent cells, que também compõem o kit TOPO TA Cloning[®] – Invitrogen), 2 µL da reação de clonagem foram adicionados a um tubo de microcentrífuga contendo as bactérias competentes e incubados por um intervalo de tempo de 30 min. As células foram aquecidas a 42 °C por 30 s, e imediatamente transferidas para o banho de gelo, promovendo o choque térmico. Ao tubo foram adicionados 250 µL de meio SOC (conforme especificações do fabricante) a 25 °C e o material, incubado a 37 °C por 1 h sob agitação horizontal. Após o período de incubação, 10 – 50 µL de reação de transformação foram espalhados sobre placas de meio LB contendo 50 µg.mL⁻¹ de ampicilina (Invitrogen), priorizando a seleção de bactérias transformadas com o vetor, e 50 µg.mL⁻¹ de x-gal. Após o inóculo ter sido absorvido as placas foram incubadas a 37 °C por um período de 12-19 h. A identificação das colônias que possuem os vetores recombinantes foi feita a partir da análise da resistência ao antibiótico e funcionalidade do gene Lac Z, onde as bactérias transformadas resistentes a ampicilina, produziram colônias azuis (colônias que receberam apenas o vetor) e brancas (colônias que receberam o vetor pCR2.1 TOPO ligado ao fragmento de cDNA da AOS). Para a análise das colônias que continham o vetor ligado ao fragmento, todas as colônias brancas e uma colônia azul foram retiradas e submetidas a análise dos clones.



Esquema 2: Vetor pCR[®] 2.1 TOPO[®] produzido pela Invitrogen, utilizado para a clonagem do fragmento amplificado.

3.3.1.7. ANÁLISE DOS CLONES POSITIVOS POR EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DOS VETORES

As colônias brancas de bactérias crescidas em placas que supostamente contem o inserto foram repicadas em meio LB líquido contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e crescidas sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C por 16 h. Após esse período, os vetores pCR[®] 2.1 – TOPO[®] (esquema 2) contidos nas bactérias transformadas foram extraídos e isolados pelo o método de lise utilizando-se o Kit Concert Rapid Plasmid Purification System[®] (GIBCO) seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. Ao fim do processo parte das moléculas de DNA plasmidial resultantes foram armazenados a –20 °C. O material restante foi analisado quanto a integridade do inserto ligado ao vetor de clonagem através de digestão do vetor com a enzima *EcoR* I.

O vetor pCR2.1 – TOPO possui sítios de restrição para a enzima *EcoR* I flanqueando a região de ligação ao inserto, portanto a digestão com a enzima *EcoR* I, abre o vetor e ao mesmo tempo libera o fragmento inserido. A mistura de reação

de digestão foi feita com a adição de 2 μ L de vetores (pCR2.1 – TOPO contendo o fragmento) isolados, conforme descrito acima, 1 μ L de tampão 10 x REact buffer 3[®], e 6 μ L de água ultra pura. A reação foi iniciada pela adição de 1 μ L da enzima *EcoR* I completando um volume total de 10 μ L e incubação a 37 °C por 2 h. Após esse intervalo, as amostras foram analisadas por fracionamento em gel de agarose 1,2 %. Os clones contendo o fragmento de 950 pb foram então denominados pCR2.1-AOS.

3.3.1.8. SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DE cDNA DA AOS DE MARACUJÁ

Para o preparo do clone pCR2.1-AOS para sequenciamento, clones positivos foram submetidos a isolamento de DNA plasmidial (conforme descrito no item 3.12) visando a obtenção de fragmentos em quantidade suficiente para o processo (~800 ng). O sequenciamento do fragmento de cDNA da AOS de maracujá foi realizado com a colaboração da Dr^a Ana Carolina Vicente Caetano (FIOCRUZ-RJ). No processo, foram utilizados os “Kits” de sequenciamento ABI Prism Dye Primer[®] e Dye Terminator[®] (Perkin Elmer) seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. Utilizamos um sequenciador automático ABI Model 370 (Perkin Elmer). A análise e comparação das sequências obtidas foi feita com a utilização do programa GCG (Genetic Computer Group)

3.3.1.9. ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADA PELO FRAGMENTO E COMPARAÇÃO COM ENZIMAS DE OUTRAS ESPÉCIES DE PLANTAS

A dedução da seqüência de aminoácidos e o alinhamento foram feitos usando-se o algoritmo do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/blast>) e do Clustal (<http://www.expasy.org>) (Altschul *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1994). A análise filogenética foi feita usando-se seqüências de AOS obtidas de banco de genes as quais foram alinhadas com o programa Clustal W 1.83 (<http://www.genebee.msu.su/clustal/basic.htm>) com configuração padrão (Thompson *et al.*, 1994).

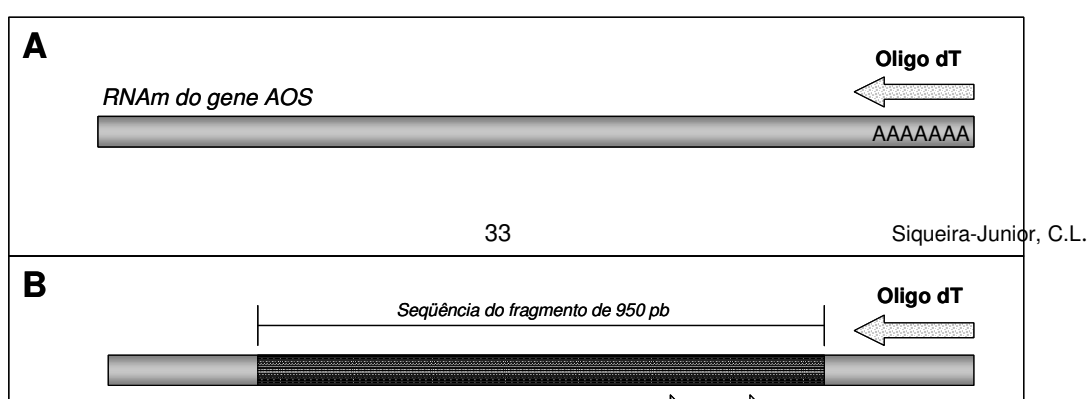
3.3.2. CLONAGEM MOLECULAR DO FRAGMENTO CORRESPONDENTE A REGIÃO 3' DO cDNA DA AOS

3.3.2.1. DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DA REGIÃO 3' DO cDNA DE AOS

Analizando a sequência de nucleotídeos do fragmento de ~950 pb do cDNA de AOS, foram desenhados dois iniciadores específicos de uma sequência correspondente ao final da sequência do fragmento. As sequências de nucleotídeos utilizadas nos iniciadores foram as seguintes: “Foward 1” → 5' GTA ATC GAG AGC CAC GAC GCG 3' (AOS3a); “Foward 2” → 5' GCC GCA TCA GTA TGG CAA AGC 3' (AOS3b). Esses iniciadores foram utilizados para a amplificação de dois fragmentos distintos, correspondentes a região 3' do cDNA de AOS. Ambos os fragmentos amplificados continham uma sequência de sobreposição com o fragmento de 950 pb (Esquema 3), priorizando a análise posterior dos fragmentos e clonagem do cDNA total da AOS. Os iniciadores foram sintetizados e adquiridos da Invitrogen.

3.3.2.2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3' DO CDNA DA AOS DE MARACUJÁ POR REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

As reações de RT foram realizadas para a produção de uma fita de cDNA complementar a partir das fitas de RNA total de plantas de maracujá expostas a vapores de MJ por 12 h, extraídas conforme descrito no item 3.3.1.2. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o Kit “ThermoScript RT-PCR systems”[®], baseando-se nas especificações do fabricante. A mistura de reação de RT foi feita conforme descrito no item 3.3.1.4 dessa seção.



Esquema 3: Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a obtenção dos fragmentos referentes a região 3' do cDNA da AOS de maracujá. **A)** Síntese da primeira fita de cDNA partindo da amplificação por RT-PCR com o iniciador oligo dT. **B)** Amplificação de fragmentos distintos por PCR com os iniciadores específicos AOS3a e AOS3b, juntamente com o iniciador oligo dT. Regiões escuras, representam a seqüência de 950 pb do cDNA da AOS. O esquema foi feito mostrando-se a representação em fita simples para a simplificação.

3.3.2.3. AMPLIFICAÇÃO DA SEGUNDA FITA DA REGIÃO 3' DO CDNA DA AOS DE MARACUJÁ POR PCR

A síntese da segunda fita de cDNA foi feita com a utilização da enzima “*Platinum™ Taq DNA polymerase high fidelity*” utilizando, como molécula molde, a fita de cDNA obtida no processo de RT-PCR (esquema 3-B). A reação de PCR foi feita do mesmo modo como descrito no item 3.3.1.5, sendo neste caso usado o conjunto de iniciadores AOS3a ou AOS3b e olido dT₁₈. 10 pmol. μL^{-1} .

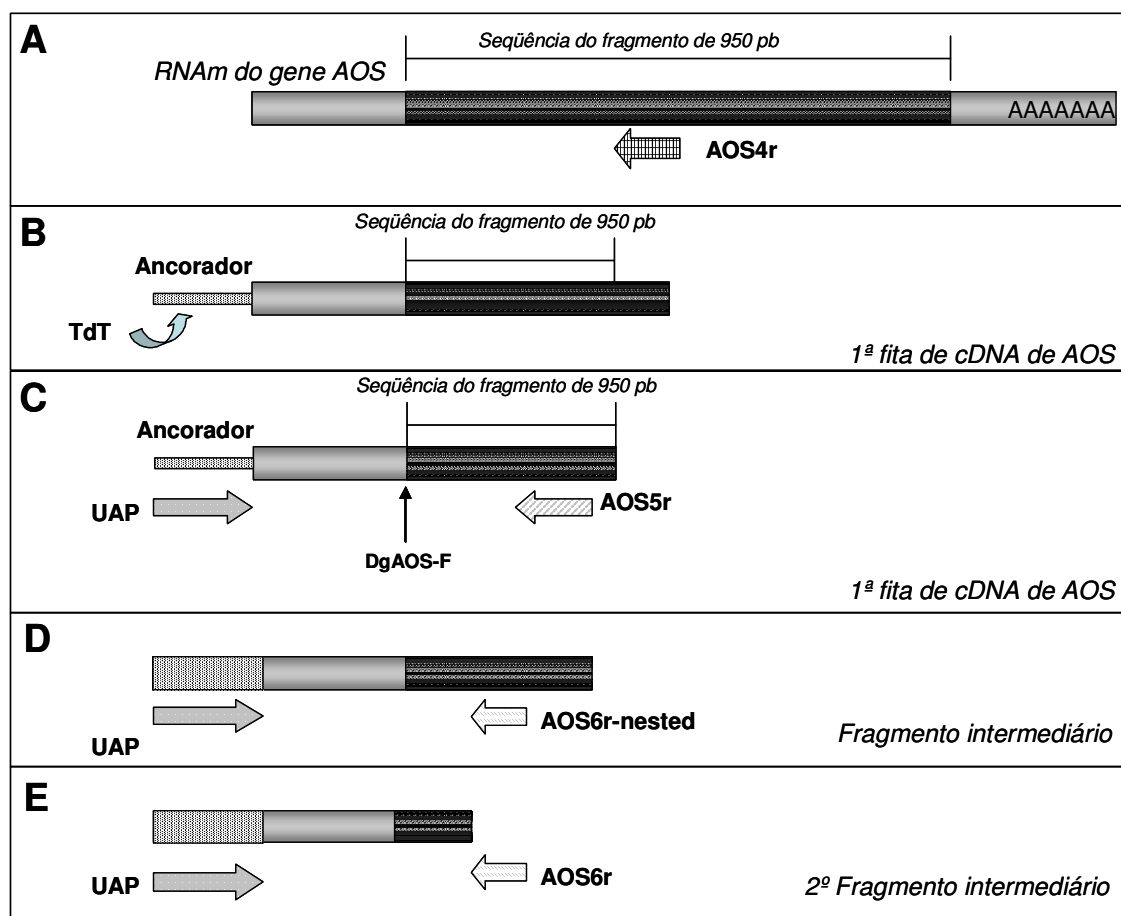
3.3.2.4. ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO DA REGIÃO 3' DO CDNA DA AOS DE MARACUJÁ

As amostras amplificadas, por PCR, foram analisadas por fracionamento em gel de agarose 1,2 %. Os fragmentos foram ligados ao vetor pCR[®] 2.1 – TOPO[®] conforme descrito no item 3.3.1.6, e a análise dos clones positivos foi feita conforme descrito no item 3.3.1.7. Os clones positivos foram então nominados de pCR2.1-AOS3a e pCR2.1-AOS3b para os fragmentos amplificados a partir dos iniciadores AOS3a e AOS3b, respectivamente. O clone pCR2.1-AOS3b, foi submetido a isolamento de DNA plasmidial (conforme descrito no item 3.3.1.7) visando a obtenção de fragmentos em quantidade suficiente para o processo (~800 ng). O seqüenciamento do fragmento de cDNA da AOS de maracujá foi realizado com a colaboração da Dr^a Ana Carolina Vicente Caetano (FIOCRUZ-RJ). A análise da seqüência deduzida de aminoácidos e o alinhamento dessa seqüência com seqüências de outras AOS de plantas foi feita usando-se o algoritmo do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/blast>) e do Clustal (<http://www.expasy.org>) (Altschul *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1994), baseando-se na mesma metodologia descrita no item 3.3.1.9.

3.3.3. CLONAGEM MOLECULAR DE FRAGMENTOS DA REGIÃO 5' DO cDNA DA AOS DE FOLHAS DE MARACUJÁ

3.3.3.1. DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DA REGIÃO 5' DO cDNA DA AOS

Analizando a sequência de nucleotídeos do fragmento de ~950 pb do cDNA de AOS, foram desenhados três iniciadores específicos para a obtenção de um fragmento de cDNA correspondente a região 5' do cDNA, utilizando-se a técnica de RACE 5' (do inglês, *Rapid Amplification of cDNA Ends*). As sequências de nucleotídeos para os iniciadores foram as seguintes: "Reverse 1" → 5' GCC TTT CTC TGC GAT TTC CTT CTC 3' (AOS4r), localizada a uma distância de 150 nucleotídeos "downstream" da sequência do iniciador DgAOS-F ; "Reverse 2" → 5' CCG TTA AAC AAC TCG CTG AAA C 3' (AOS5r), localizada a uma distância de 125 nucleotídeos "downstream" da sequência do iniciador DgAOS-F; "Reverse nested" → 5' CTC GGG GAC TAT ATG GTC GCT GCG 3' (AOS6r), localizada a uma distância de 100 nucleotídeos "downstream" da sequência do iniciador DgAOS-F (Esquema 4). Os iniciadores foram sintetizados e adquiridos da Invitrogen. Juntamente com os iniciadores desenhados foram utilizados ancoradores (iniciadores que compõem o Kit RACE 5'[®]) que possibilitam a amplificação da região 5' do RNAm utilizado como molde, para a qual não se tem informação de sequência impossibilitando o desenho de iniciadores específicos.



Região 5' do cDNA



UAP → iniciador que anela com o ancorador
Sequência presente do fragmento de 950 pb

Esquema 4: Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a obtenção do fragmento referente a região 5' do cDNA da AOS de maracujá. **A)** Síntese da primeira fita de cDNA partindo da amplificação por RT-PCR com o iniciador oligo dT. **B)** Ligação de um ancorador (fornecido no Kit) na região 5' da primeira fita de cDNA. **C)** Amplificação de um fragmento intermediário por PCR com os iniciadores específicos AOS4r e UAP (fornecido no kit). **D)** Amplificação de um segundo fragmento intermediário por PCR com os iniciadores específicos AOS5r e UAP (fornecido no kit). **E)** Amplificação do fragmento correspondente a região 5' do cDNA da AOS por PCR com os iniciadores específicos AOS6r e UAP (fornecido no kit). Regiões escuras, representam a seqüência de 950 pb do cDNA da AOS. O esquema foi feito mostrando-se a representação em fita simples para a simplificação.

3.3.3.2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 5' DO cDNA DA AOS DE MARACUJÁ POR RACE 5'

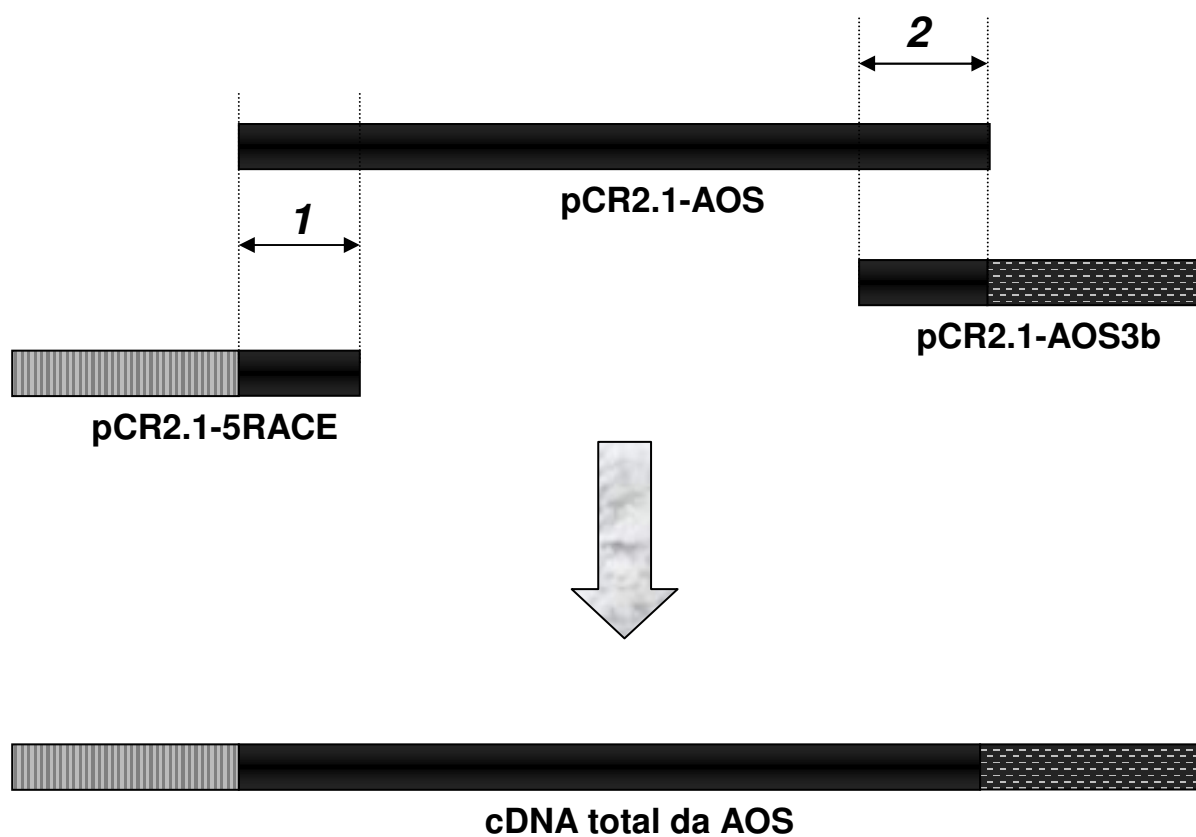
A amplificação do fragmento correspondente a região 5' do cDNA da AOS de maracujá, foi feita com a utilização do Kit RACE 5'[®]. A síntese das fitas de cDNA foi feita utilizando, como molécula molde, fitas de RNA total de plantas de maracujá expostas a vapores de MJ por 12 h extraídas conforme descrito no item 3.3.1.2. As reações de RT/PCR foram feitas conforme especificações do fabricante. Em resumo, amostras de RNA total 5 µg, foram utilizadas juntamente com o iniciador AOS4r em uma reação de RT/PCR por 50 min a 42 °C. O produto de amplificação foi purificado em coluna de purificação S.N.A.P. (que acompanha o kit) conforme instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram incubados por 10 min a 37 °C em tampão de reação para a introdução da cauda TdT e em seguida aquecidos por 10 min a 65 °C. O material foi então submetido a nova reação de PCR, juntamente com o iniciador AOS5r e o iniciador ancorador "Abridged Anchor primer" (AAP) (que acompanha o kit), que foi feita com 40 ciclos de denaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores a 45 °C por 1 min e polimerização a 72 °C por 1 min. Finalmente, 5 µL de produtos de PCR obtidos foram diluídos em 495 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). Da solução diluída, 5 µL foram utilizados como molde para nova reação de PCR, juntamente com o iniciador AOS6r (nested) e o iniciador UAP (que acompanha o kit). A solução de amplificação foi dividida em dois tubos (contendo 25 µL cada) e colocados no termociclador, "Primus 96 Plus", para a reação de PCR que foi feita com 40 ciclos de denaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores a 45 °C por 1 min e polimerização a 72 °C por 1 min. Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 1,2 % priorizando a observação da amplificação da região 5' do cDNA da AOS.

3.3.3.3. ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO DA REGIÃO 5' DO cDNA DA AOS DE MARACUJÁ

As amostras amplificadas, por PCR, foram analisadas por fracionamento em gel de agarose 1,2 %. O fragmento obtido foi ligado ao vetor pCR[®] 2.1 – TOPO[®] conforme descrito no item 3.3.1.6, e a análise dos clones positivos foi feita conforme descrito no item 3.3.1.7. O clone positivo foi denominado de pCR2.1-AOS5race. O clone pCR2.1-AOS5race, foi submetido a isolamento de DNA plasmidial (conforme descrito no item 3.12) visando a obtenção de fragmentos em quantidade suficiente para o processo (~800 ng). O seqüenciamento do fragmento de cDNA da AOS de maracujá foi realizado com a colaboração da Dr^a Ana Carolina Vicente Caetano (FIOCRUZ-RJ). A análise da seqüência deduzida de aminoácidos e o alinhamento dessa seqüência com seqüências de outras AOS de plantas foi feita usando-se o algoritmo do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/blast>) e do Clustal (<http://www.expasy.org>) (Altschul *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1994), baseando-se na mesma metodologia descrita no item 3.14.

3.3.4. ANÁLISE DA SOBREPOSIÇÃO DE SEQÜÊNCIA ENTRE OS FRAGMENTOS DE cDNA PARCIAL DE AOS OBTIDOS

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos fragmentos obtidos pCR2.1-AOS, pCR2.1-AOS3b e pCR2.1-AOS5race, foi feito utilizando-se o programa Clustal W 1.83 (<http://www.genebee.msu.su/clustal/basic.htm>) com configuração padrão (Thompson *et al.*, 1994) (esquema 5). Após o alinhamento, as regiões de sobreposição entre os três fragmentos foram analisadas quanto a identidade da seqüência de nucleotídeos, permitindo a obtenção da seqüência do cDNA total da AOS de maracujá.



Esquema 5: Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para a reconstituição do cDNA total da AOS de maracujá. 1- Região de sobreposição de sequência entre os clones pCR2.1-AOS e pCR2.1-5RACE; 2- Região de sobreposição de sequência entre os clones pCR2.1-AOS e pCR2.1-AOS3b.

3.3.5. CLONAGEM MOLECULAR DO cDNA TOTAL AOS DE FOLHAS DE MARACUJÁ

3.3.5.1. DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DO cDNA DA AOS

Analisando a sequência de nucleotídeos correspondente aos fragmentos pCR2.1-AOS5race e pCR2.1-AOS3b, correspondentes as regiões 5' e 3' do cDNA da AOS, respectivamente, foram desenhados iniciadores específicos correspondentes às sequências que representam os códons de início e fim da tradução da proteína AOS. As sequências de nucleotídeos para os iniciadores foram as seguintes: "Forward" → 5' AGG AAA GTC CCC GGA GAT TAT GGC C 3' (AOSTF) e "Reverse" → 5' AGA ATC AAT TGG TGC TTT CTT CAA GG 3' (AOSTR). Os iniciadores foram sintetizados e adquiridos da Invitrogen.

3.3.5.2. AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DA SEGUNDA FITA DO cDNA TOTAL DA AOS DE MARACUJÁ POR PCR

a amplificação do cDNA total da aos de maracujá foi feita com a utilização da enzima "*PlatinumTM Taq DNA polymerase high fidelity*" utilizando, como molécula molde, fitas de cDNA obtida no processo de RT-PCR, descrito no item 3.10.3. A reação de PCR foi feita termociclador "Primus 96 Plus". As misturas de reação foram montadas do seguinte modo: 37 μL de água; 5 μL de tampão da enzima Platinum *Taq* 10 x (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) (1x); 2 μL de MgCl_2 50 mM (2 mM); 2 μL de DNTP 10 mM (0,4 mM); 1 μL de iniciador AOSTF 10 pmol. μL^{-1} (10 pmol); 1 μL de iniciador AOSTR 10 pmol. μL^{-1} (10 pmol); 1 μL do produto de RT-PCR (1ª fita de cDNA); 1 μL da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase 1 u. μL^{-1} (1 u). As soluções com volumes totais de 50 μL foram divididas em dois tubos de PCR contendo 25 μL cada. Esses tubos foram colocados no termociclador para a reação de PCR que foi feita com 5 ciclos de denaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 58 °C por 1 min e polimerização a 72 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de

denaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 45 °C por 1 min e polimerização a 72 °C por 1 min.

3.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADAS PELO cDNA DA AOS

A análise filogenética da proteína codificada pelo cDNA da AOS, comparada a outras proteínas AOS de várias espécies foi feita utilizando-se o programa MEGA 4 (Kumar *et al.*, 2004)

3.5. ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE AOS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE BIÓTICO

3.5.1. MATERIAL VEGETAL PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE AOS

Plantas de maracujá foram submetidas a ferimento mecânico com o auxílio de um pinça hemostática por diferentes períodos (0 ; 0,5; 3; 6; 9; 12 e 24 h). Nas plantas feridas, as folhas injuriadas foram denominadas “feridas”, enquanto que as folhas adjacentes, não injuriadas, foram denominadas sistêmicas, sendo também utilizadas na análise da expressão sistêmica do gene da AOS. Um outro conjunto de plantas foram expostas a vapores de MJ, conforme descrito no item 3.2.1, pelo mesmo intervalo de tempo (0 ; 0,5; 3; 6; 9; 12 e 24 h). Para cada tratamento foram usadas três plantas. O RNA total de tecido foliar de plantas de maracujá foi extraído como descrito no item 3.3.1.2

3.5.2.ELETROFORESE, EM GEL DESNATURANTE, DE RNA TOTAL PARA ANÁLISE DE RNAs

Um gel de agarose foi preparado a uma concentração de 1,4% em água_DEPC. Após estar completamente fundido, foi resfriado a 60 °C, e então acrescido de formaldeído 37% (MERCK) à concentração final de 2,2 M e tampão MOPS 10 x (MOPS 0,1 M, pH 7,0, acetato de sódio 40 mM e EDTA 5 mM) a concentração final de 1x, constituindo um volume total de 100 mL. A mistura de

reação (gel) foi homogeneizada e então vertida sobre a placa de vidro apropriada para o processo de fracionamento, e mantido por 1 h, priorizando a solidificação.

O volume correspondente a 15 µg de RNA total de cada amostra foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga no qual foi adicionado água-DEPC para igualar o volume das amostras. Posteriormente, foram adicionados dois volumes de tampão de desnaturação (20 µl de tampão MOPS 10 x, 200 µl de formamida 100%, 70 µL de formaldeído 37% e 10 µL água), e as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 60 °C por 1 h. Após o período de incubação, as amostras foram transferidas para banho de gelo (4 °C) por 10 min e então foram acrescidas de brometo de etídio (200 ng.mL⁻¹) e tampão de amostra 10x (MOPS 10x, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,25%). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4 °C por 30 s a 10.000 x g e, em seguida, aplicadas no gel desnaturante. O fracionamento foi feito em cuba contendo tampão MOPS 1x, a uma voltagem constante de 10 V por cm até que o corante atingisse aproximadamente 7 cm do comprimento total do gel.

Após a corrida, o gel foi transferido para uma cuba limpa e lavado com água-DEPC por 15 min sob agitação periódica para remover o formaldeído. Finalmente, a água foi substituída por tampão SSC 10x (citrato de sódio 0,3 M, NaCl 3 M) no qual o gel foi lavado por mais 5 min, e em seguida submetido ao processo de transferência.

3.5.3. TRANSFERÊNCIA DO RNAs PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE

A transferência das amostras de RNA foi feita através de eluição por capilaridade (Sambrook e Russel, 2001). Em um recipiente, contendo tampão de transferência (SSC 10x), foi colocado um suporte para manter uma placa de vidro acima do nível de tampão. Sobre a placa de vidro foi posicionado um pedaço de papel de filtro com abas laterais compridas que permitissem o embebimento do papel no tampão. Acima desse papel, foram colocados outros 3 pedaços retangulares de papel de filtro (com as medidas da placa de vidro) umedecidas em SSC 10x. Sobre as folhas de papel, foi depositado o gel de agarose com o lado dos poços para baixo, seguido da membrana de nitrocelulose (com o mesmo tamanho

do gel), previamente embebida em tampão SSC 10x. Uma nova camada de papéis de filtro (3 folhas com as dimensões da membrana e do gel), também umedecidas com tampão SSC 10x, foi colocada sobre a membrana de nitrocelulose. Para evitar o contato entre os papéis localizados acima da membrana e abaixo do gel, foram cortados pedaços de folha de acetileno e colocados em torno do gel. Finalmente, acima dos papéis de filtro, foram colocados vários pedaços de papel toalha (nas mesmas dimensões do gel). Todo o aparato foi coberto utilizando-se uma outra placa de vidro com um contrapeso. A transferência foi feita em 16 h e ao final do processo o aparato foi desmontado e a membrana de nitrocelulose foi acondicionada entre duas folhas de papel toalha e aquecida a 80 °C por um período de 2 h para a fixação das amostras de RNA.

3.5.4. MARCAÇÃO DE SONDA RADIOATIVA ESPECÍFICA DE AOS

O fragmento de cDNA de AOS clonado no vetor pCR2.1-AOS foi utilizado como fita molde para a síntese da sonda marcada radioativamente. O procedimento foi feito utilizando o kit Random Primer DNA Labeling System® (Gibco), conforme instruções do fabricante. O kit é provido de DNA polimerase (fragmento Klenow), iniciadores hexâmeros aleatórios e dNTPs. O dCTP foi marcado com radioatividade ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$) e os outros três nucleotídeos não marcados (dATP, dTTP e GTP) serviram como precursores da reação.

3.5.5. PURIFICAÇÃO DAS SONDAS MARCADAS RADIOATIVAMENTE

As sondas sintetizadas foram purificadas de nucleotídeos não incorporados, em minicolunas contendo resina sephadex G-50. A resina sephadex G-50 (500 μL) foi inicialmente lavada com água ultra-pura. A minicoluna foi introduzida em um tubo de centrifuga e a resina foi centrifugada a 3.000 rpm por 1 min. A reação de síntese da sonda foi aplicada sobre a resina e a coluna foi novamente centrifugada, em um outro tubo coletor, a 3.000 rpm por 1 min. Com esse procedimento, a sonda fica no tubo coletor e o material não incorporado fica retido na coluna. Após a purificação, o volume obtido foi desnaturado a 100 °C por 10 min em placa aquecedora, e em seguida resfriado e mantido em banho de gelo até o momento do processo de hibridização.

3.5.6. HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA DE NITROCELULOSE COM A SONDA RADIOATIVA

A membrana foi pré-hibridizada separadamente a 42 °C por 1 h, em 15 mL de solução de pré-hibridização (fosfato de sódio 50 mM pH 6,8, solução de Denhardt's 5x (PVP 0,1%, ficol 0,1% e BSA 0,1%), formamida 50%, SSC 5x, DNA de esperma de arenque 100 µg.mL⁻¹). Após esse período, foi adicionado SDS 0,1% à solução e a sonda marcada com radioatividade, iniciando-se o processo de hibridização que ocorreu por 16 h a 42 °C. Após a hibridização a solução foi descartada de depósito próprio para rejeito radioativo e a membrana foi lavada 2 vezes em solução contendo SSC 0,1x, SDS 0,1% sob agitação constante por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada 2 vezes em solução SSC 0,1x, SDS 0,1 % por 15 min a 50 °C. Finalmente, a membrana foi envolvida em filme plástico (PVC) e exposta a filme para radiografia (X-OMAT, Eastman Kodak) em cassetes apropriados para exposição à radiação, mantidas nessas condições por 24 h a -80 °C. Após esse período o filme foi revelado.

3.6. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE DE AOS EM PLANTAS DE MARACUJÁ

3.6.1. MATERIAL VEGETAL PARA ANÁLISE DO MATERIAL GENÔMICO

O DNA genômico de plantas de maracujá foi extraído utilizando o DNAzol[®] (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, como se segue. Foram pulverizadas folhas de maracujá com nitrogênio líquido e, cerca de 0,1 g foi transferida para um tubo de microcentrifuga contendo 300 µL de DNAzol[®] e 300 µL de clorofórmio. Após centrifugação de 10 min a 12.000 xg, a fase aquosa da solução foi transferida para outro tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 1 volume de etanol absoluto, incubado por 5 min a 25 °C e centrifugado a 5.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado; enquanto que o precipitado foi lavado inicialmente com uma mistura de DNAzol[®] e etanol absoluto (1,0 : 0,75) e posteriormente com

etanol 75% (v/v). Essa solução foi centrifugada por 5 min a 4.000 xg e o precipitado, solubilizado com 75 µL de tampão TE (pH 8,0).

Para a quantificação do DNA na amostra foi utilizado o espectrofotômetro Gene Quantpro®, Pharmacia Biotech, e como padrão, foi usado o tampão TE. Assim, 1 µl da solução contendo DNA genômico extraído foi diluído em 49 µl de tampão TE (pH 8,0) e submetido à leitura de 260 nm. A quantidade do DNA genômico obtido foi calculada seguindo a relação: $1 \text{ DO}_{260\text{nm}} = 50\mu\text{g.mL}^{-1}$ de DNA genômico (Sambrook e Russell, 2001).

3.6.2. DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

As amostras de DNA genômico foram transferidos para tubos de microcentrífuga nos quais foram submetidas a restrição pelas enzimas *EcoR* I, *Kpn* I e *Sma* I. As misturas de reação de digestão foram feitas com a adição de volumes correspondentes a 20 µg de DNA genômico, 20 µL de tampão 10x REact buffer®, e água ultra pura em quantidade necessária para completar o volume total de 200 µL de reação. A reação foi iniciada pela adição, em cada tubo, de 6 µL da respectiva enzima de restrição. As amostras foram incubadas à 30 °C, para a enzima *Sma* I, e 37 °C para as enzimas *EcoR* I e *Kpn* I por um período de 2 h. Após esse intervalo, foram adicionados mais 6 µL de cada enzima a seus respectivos tubos, que foram novamente incubados por mais 16 h, nas respectivas temperaturas. Após esse período, nos tubos contendo as amostras de DNA digerido foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio (invitrogen) e mantido sob agitação constante. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 12.000 xg à temperatura ambiente e o sobrenadante contendo a fase aquosa de cada tubo foi recuperado e transferido para novos tubos de microcentrífuga. Ao material foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M seguido da adição de 2 volumes de etanol absoluto. O material foi armazenado a – 70 °C por 30 min e posteriormente centrifugado a 12.000 xg por 150 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o material sedimentado em cada tubo foi lavado com 500 µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 12.000 xg por 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o

material sedimentado foi mantido a 25 °C até a secagem. Os fragmentos digeridos contidos em cada tubo foram então solubilizados em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 0,01M, pH 8,0, EDTA 1 mM).

3.6.3. ELETROFORESE DE DNA GENÔMICO

Um gel de agarose foi preparado a uma concentração de 0,8% em água-DEPC. A agarose foi fundida a 100 °C, evitando-se, no entanto, o processo de fervura. A Solução foi resfriada a 50 °C e a ela foi adicionado brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹) sendo homogeneizada e vertida sobre uma placa preparada para o processo de eletroforese. O material foi mantido a temperatura ambiente preconizando a solidificação do gel. As amostras de DNA genômico digeridos foram preparadas misturando-se 30 µl de DNA digerido solubilizado em TE (conforme descrito acima), e 20 µL de tampão de amostra 4x (glicerol 50%, TAE 4x e azul de bromofenol (0,025%). Como controle, um volume correspondente a 20 µg de DNA genômico não digerido foi também incubado com tampão de amostra 4x. As amostras foram então homogeneizadas e aplicadas no gel solidificado. O fracionamento foi feito a uma voltagem inicial de 20 V, aumentando-se 10 V a cada cm de gel, alcançando uma voltagem constante de 70 V ao fim do fracionamento. No processo de fracionamento foi utilizado o marcado de peso molecular “1 KB plus DNA ladder” (Invitrogen). Após o fracionamento, o gel foi lavado com água ultra-pura e em seguida mergulhado em uma cuba contendo tampão de depuração (HCl 0,2 N), sob leve agitação, o tempo suficiente para que o corante contido no tampão de amostra de cor azul passe a apresentar coloração amarelada devido a acidificação do gel. Em seguida o gel foi novamente lavado em água ultra-pura e mergulhado em tampão alcalino contendo NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M por 45 min sob leve agitação. Após esse processo foi feita uma nova lavagem do gel em água ultra-pura, e a neutralização por imersão do gel em tampão de neutralização (Tris-HCl 1 M, pH 7,4; NaCl 1,5 M) por 30 min efetuando a troca do tampão por uma solução fresca a cada 15 min. Finalmente, o gel foi lavado em água ultra-pura e submetido ao processo de transferência.

3.6.4. TRANSFERÊNCIA DO DNA PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE E HIBRIDIZAÇÃO COM SONDA RADIOATIVA

A transferência das amostras de DNA foi feita conforme descrito no item 3.5.3. A marcação da sonda radioativa foi feita como descrito no item 3.5.4 e a hibridização da membrana com a sonda marcada radioativamente foi feita conforme o item 3.5.6.

3.7. IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA HOMÓLOGA A AOS DE TOMATE EM FOLHAS DE PLANTAS DE MARACUJÁ

3.7.1. PREPARO DAS AMOSTRAS DE FOLHAS, DESIDRATAÇÃO E INCLUSÃO EM RESINA LR Gold

Para as análises de imunocitoquímica, folhas de maracujá, controle e exposta a vapor de MJ (conforme descrito no item 3.2.1), foram extraídas e cortadas em pequenos pedaços. Os cortes foram fixados em glutaraldeído 0,01% (tipo I) (v/v) e paraformaldeído 4% (v/v) diluídos em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 50 mM, pH 7,0, por 2 h a temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão cacodilato 50 mM pH 7,0, por 30 min cada, e em seguida desidratadas, em soluções com concentrações crescentes de metanol, por 30 min (metanol 50%), por 1 h (metanol 70%) e por mais 1 h (metanol 90%). Após a desidratação procedeu-se a infiltração da resina LR Gold (Sigma) do seguinte modo: metanol 50% + 50% de LR Gold por 18 h, metanol 30% + 70% de LR Gold por 18 h e finalmente em 100% de LR Gold por 2 dias. Todas as etapas de desidratação e infiltração foram feitas a -20°C . Após esse período, as amostras foram transferidas para microtubos de 500 μL , aos quais acrescentou-se a resina LR Gold (100%). Os tubos foram mantidos a -20°C , sob a incidência de luz branca por 5 dias para que a resina fosse polimerizada.

3.7.2. IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA HOMÓLOGA A AOS DE TOMATE

Cortes com espessuras de 60 nm das amostras emblocadas de folhas foram coletadas em grades de níquel cobertas com filme Formvar e então usadas para o ensaio. Inicialmente as amostras foram incubadas em gotas (40 µL) de cloreto de amônio 50 mM por 2 h, para bloqueio de cargas e em seguida incubadas com PBS (NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4 e NaCl 0,15M) contendo BSA 1% por 2 h, para bloqueio de sítios não específicos. Após esse segundo bloqueio, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário produzido contra AOS de tomate (1:200), diluído em PBS-BSA, por 2 h e em seguida foram feitas 10 lavagens com PBS-BSA por 10 min cada. Após as lavagens, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, 1:200, conjugado com partículas de 10 nm de ouro coloidal), por 2 h, seguindo-se de mais um ciclo de lavagens em PBS-BSA. O processo final de lavagem foi realizado em PBS por 20 min e posteriormente em água deionizada por mais 20 min.

Após a marcação, o material das grades foi contrastado com acetato de uranila a 5% e acetato de chumbo, por 5 min em cada solução, e foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 900). As provas-controle de marcação foram feitas usando-se o soro pré-imune de coelho e o anticorpo conjugado com partículas de ouro coloidal de 10 nm.

3.8. DETECÇÃO DA INDUÇÃO DE PROTEÍNAS DEFENSIVAS: INIBIDORES DE PROTEINASE CISTEÍNICA, POR FERIMENTO MECÂNICO E TRATAMENTO COM METIL JASMONATO

3.8.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO DO TECIDO FOLIAR DE PLANTAS DE MARACUJÁ

Plantas de maracujá foram tratadas e feridas como descrito no item 3.2. Após 24 h, as folhas das plantas controle, feridas e tratadas com MJ foram extraídas baseando-se na metodologia descrita por Jacinto *et al* (1998). As folhas (100 mg) congeladas em nitrogênio líquido foram maceradas em um almofariz com auxílio de um pistilo. O material macerado foi ressuspenso e mantido, por 15 min, em tampão de extração 0,05 M fosfato de sódio (pH 6,0); 10 % polivinilpolipirrolidona (PVPP)

(w/w) a 4 °C. Após esse intervalo, o material foi centrifugado a 10.000 xg a 4 °C por 30 min. Parte do sobrenadante originado foi analisado em gel de poliacrilamida 10 % e as proteínas fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose conforme descrito nos itens 3.2.5 e 3.2.5.1, respectivamente. Ensaio de imunodeteção utilizando anticorpos primários produzidos contra a cistatina do tomate (Madureira *et al.*, 2006) (1:5.000), foram realizados conforme descrito no item 3.2.5.2. As bandas imunoreativas foram visualizadas usando, proteína A peroxidase (1:2.000). A coloração foi obtida pelo uso de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) contido no "Horseradish Peroxidase Assay Kit" produzido pela BIO-RAD.

3.8.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE PROTEINASE INDUZIDOS EM FOLHAS DE MARACUJÁ

A indução de inibidores de proteinase cisteínica como resposta de defesa de plantas de maracujá foi verificada através da análise da inibição da atividade catalítica da enzima papaína, conforme metodologia descrita por Abe *et al.* (1994). Resumidamente, 1 µg de papaína (Sigma) foi pré-incubada em tampão de reação (Fosfato de sódio 0,25 M pH 6,0 contendo EDTA 2,5 mM e β-mercaptoetanol 25 mM) juntamente com 70 µg de extrato bruto foliar (item 3.8.1) por 5 min a 37 °C em um volume final de 315 µL. A reação foi iniciada pela adição de 35 µL de substrato BANA (N-benzoil-L-arginina-2-naftilamida) 5 mM em DMSO 10%. Após a incubação a 37 °C por 30 min parou-se a reação pela adição de 500 µL de HCl 2% em etanol e a coloração foi obtida pela adição de 500 µL de p-dimetilaminacinaldeído 0,06% em etanol. A atividade enzimática foi avaliada espectrofotometricamente e expressa como $\Delta OD_{540}/h/mL$.

4. RESULTADOS

4.1. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS COM ATIVIDADE DE METABOLIZAÇÃO DE 13-HIDROPERÓXIDOS EM PLANTAS DE MARACUJÁ

As proteínas AOS possuem atividade metabolizadora de 13(S)-hidroperóxidos 9(Z)11(E)15(Z) ácido octadecatrienóico, também conhecido como 13(S)-HPOT (Hamberg e Gardner, 1992). Dessa forma, o aumento da metabolização de hidroperóxidos, em resposta a tratamento de folhas de maracujá com MJ, foi testada com a utilização de 13(S)-HPOT, produzidos a partir da atividade de LOX semi-purificada de folhas de maracujá. Ao testar os extratos brutos obtidos de tecido foliar de plantas com MJ, foi verificada o aumento da redução da absorbância (234 nm), provocada pela conversão de hidroperóxidos em aleno óxidos, indicando a indução de enzima(s) com atividade metabolizadora de hidroperóxidos nas plantas tratadas, quando comparada a atividade na amostra controle (Fig. 4). Apesar da observação de uma atividade metabolizadora basal nas folhas controle, essa atividade é aumentada na ordem de 3,5 vezes nas folhas tratadas.

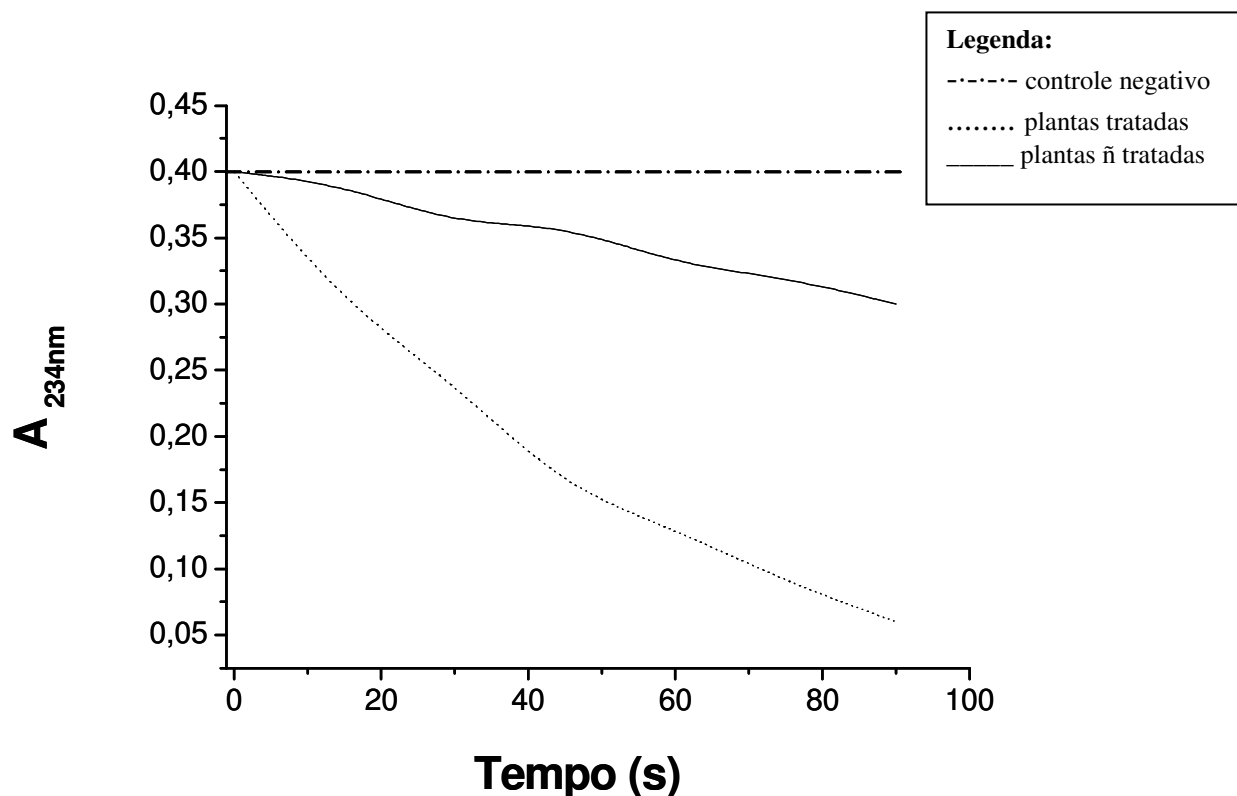


Figura 4: Metabolismo de hidroperóxidos de ácido graxo por proteínas induzidas em plantas de maracujá pelo tratamento com MJ.

A atividade das proteínas com similaridade a AOS foi testada utilizando-se 13(S)-HPOT, como substrato. A linha pontilhada representa a metabolização dos hidroperóxidos, por uma proteína similar a AOS, no extrato bruto de folhas tratadas com MJ (70 µg de proteína total); e a linha contínua, no extrato bruto de folhas controle (70 µg de proteína total). A linha tracejada/pontilhada representa a não metabolização basal dos hidroperóxidos na ausência de extrato foliar. A atividade foi medida com a utilização de um espectrofotômetro que monitora a perda da absorbância a 234nm. O gráfico representa um experimento dentre três experimentos independentes.

4.2. DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA IMUNO RELACIONADA À AOS DE TOMATE EM FOLHAS DE MARACUJÁ

Com a finalidade de detectar a síntese de AOS em plantas de maracujá, analisamos os extratos protéicos de tecido foliar de plantas controle e tratadas com metil jasmonato (MJ) por 24 h, através das técnicas de SDS-PAGE e “western blot” (Fig. 5). Como pode ser verificado, anticorpos policlonais, produzidos em coelhos, contra uma AOS recombinante de tomate (Howe *et al.*, 2000) reagem com uma proteína de ~50 kDa contida no extrato bruto foliar das plantas tratadas com MJ (Fig. 5C – raia 2). Entretanto, no extrato foliar de plantas controle, não foi observada nenhuma reação imunogênica (Fig. 5C - raia 1) Ao analisar as mesmas amostras após a incubação com soro pré-imune originado do mesmo coelho, não foram verificadas reações cruzadas com nenhuma proteína contida nas amostras (Fig. 5B). Uma segunda proteína de maior peso molecular acima de 94 kDa, contida em plantas tratadas com MJ, foi também reconhecida pelo anticorpo, nos experimentos de imunodeteção (Fig. 5C - seta menor).

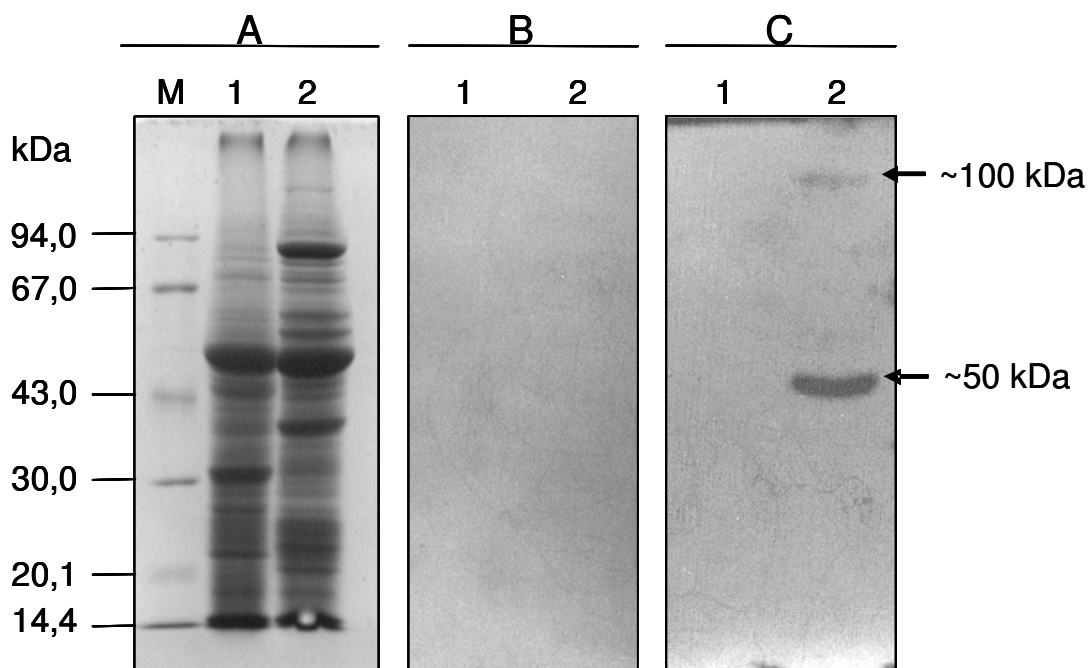


Figura 5: Acúmulo de proteína homóloga a AOS de tomate em folhas de plantas de maracujá após tratamento de 24 h com metil jasmonato.

Foram preparados 80 µg de proteínas extraídas do tecido foliar de plantas controle e tratadas. **A)** SDS-PAGE 10%: M- Marcador de peso molecular; 1- Extrato bruto foliar de plantas controle; 2- Extrato bruto foliar de plantas tratadas com MJ. **B)** Imunodeteção de AOS, com soro pré-imune. As raias 1 e 2 estão como descrito acima. Foi utilizada uma diluição de 1:5.000 de anticorpo primário e 1:1.000 de proteína A conjugada a peroxidase. **C)** Imunodeteção de AOS, com anticorpos anti AOS de tomate. As raias 1 e 2 estão como descrito acima. Foi utilizada uma diluição de 1:3.000 de anticorpo primário e 1:1.000 de proteína A conjugada a peroxidase. Os anticorpos e o soro pré-imune foram gentilmente cedidos por Dr. Gregg A. Howe, da Michigan State University. As setas indicam as proteínas que reagiram cruzadamente com o anticorpo utilizado.

4.3. CLONAGEM DO FRAGMENTO CENTRAL DE cDNA DA AOS DO MARACUJÁ

Iniciadores degenerados correspondentes a resíduos conservados da sequência de aminoácidos de AOS de plantas foram utilizados em reações de RT-PCR para amplificar um fragmento de tamanho aproximado de 970 pb a partir de RNA total extraído de folhas de maracujá tratadas com MJ por um período de 12 h. A análise do produto de amplificação por gel de agarose 1,2 % permite a observação de uma banda de tamanho de ~950 pb (Fig. 6), correspondente a distância entre os iniciadores degenerados na sequência dos genes de AOS em plantas de tomate. O produto de RT-PCR obtido, chamado a partir de então de PfAOS (AOS de *Passiflora flavicarpa*), foi então clonado em um vetor de clonagem pCR 2.1 – TOPO (Invitrogen life technologies) (3.9 kb) e utilizado para transformação de bactérias competentes *E. coli* (TOP 10^R). Após o crescimento, foram identificadas 9 colônias brancas, as quais foram analisadas em relação a presença do fragmento ~950 pb. Os DNAs plasmidiais foram então digeridos com a enzima de restrição *Eco* RI e como pode-se observar, através da análise em gel de agarose 1,2 %, apenas um dos plasmídeos dentre os 9 purificados possuía o fragmento de ~950 pb (Fig. 7 – raias 1-9). Como controle negativo, utilizamos plasmídeos purificados de uma colônia azul (Fig. 7, raia C).

O clone 7 foi submetido a seqüenciamento de DNA com a finalidade de obtenção da seqüência parcial do fragmento de ~950 pb (Fig. 8). A seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento seqüenciado foi comparada à seqüências de outras proteínas AOS de várias plantas usando-se o programa BLAST a partir da base de dados do Genbank. Como resultado (Fig. 9), a seqüência amplificada mostrou uma alta homologia as AOS de outras plantas (50 – 70%), Com base na seqüência de nucleotídeos do fragmento, foram desenhados novos iniciadores para a obtenção dos fragmentos da região 5' e 3' do cDNA da AOS pelas técnicas de RACE 5' (do inglês, *rapid amplification of cDNA ends*) e partir de reações de RT-PCR, respectivamente (Fig. 8 – setas).

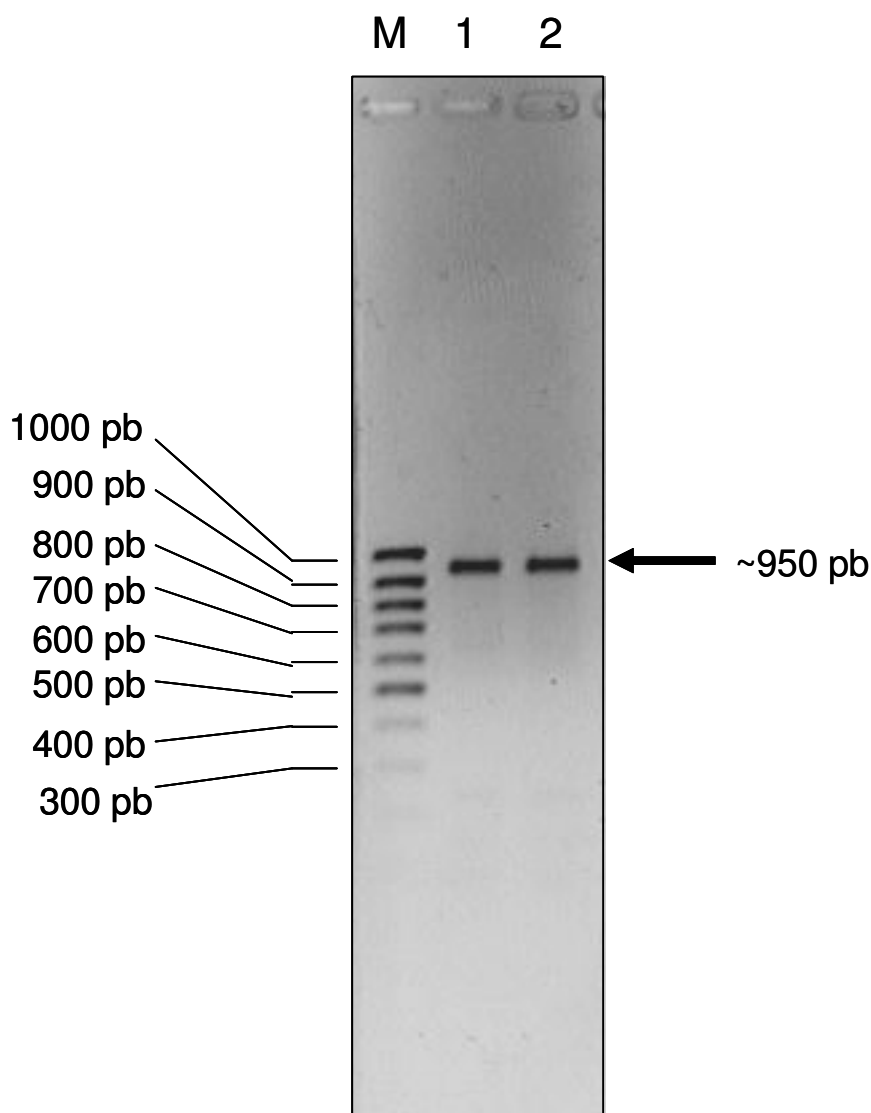


Figura 6: Visualização eletroforética do fragmento amplificado de cDNA da AOS de maracujá por RT-PCR em gel de agarose 1,2 %.

O fragmento de cDNA foi obtido por RT-PCR, a partir de RNA total extraído de tecido foliar de plantas tratadas com metil jasmonato por 12 h. Foram utilizados iniciadores degenerados de seqüências conservadas de AOS de tomate: 5' - TTC AC(CT) GG(AT) ACT T(AT)C (AG)TG CC - 3' ("forward") e 5' - TCC GG(CT) CC(AG) TT(AC) GAC CA(CT) - 3' ("reverse"), respectivamente. Raia M – Marcador; raia 1 e 2 – produto de RT-PCR (2 μ L) de duas amplificações independentes. A seta indica os fragmentos isolados em ambas as amplificações. A figura é o resultado da foto negativa do gel corado com brometo de etídeo.

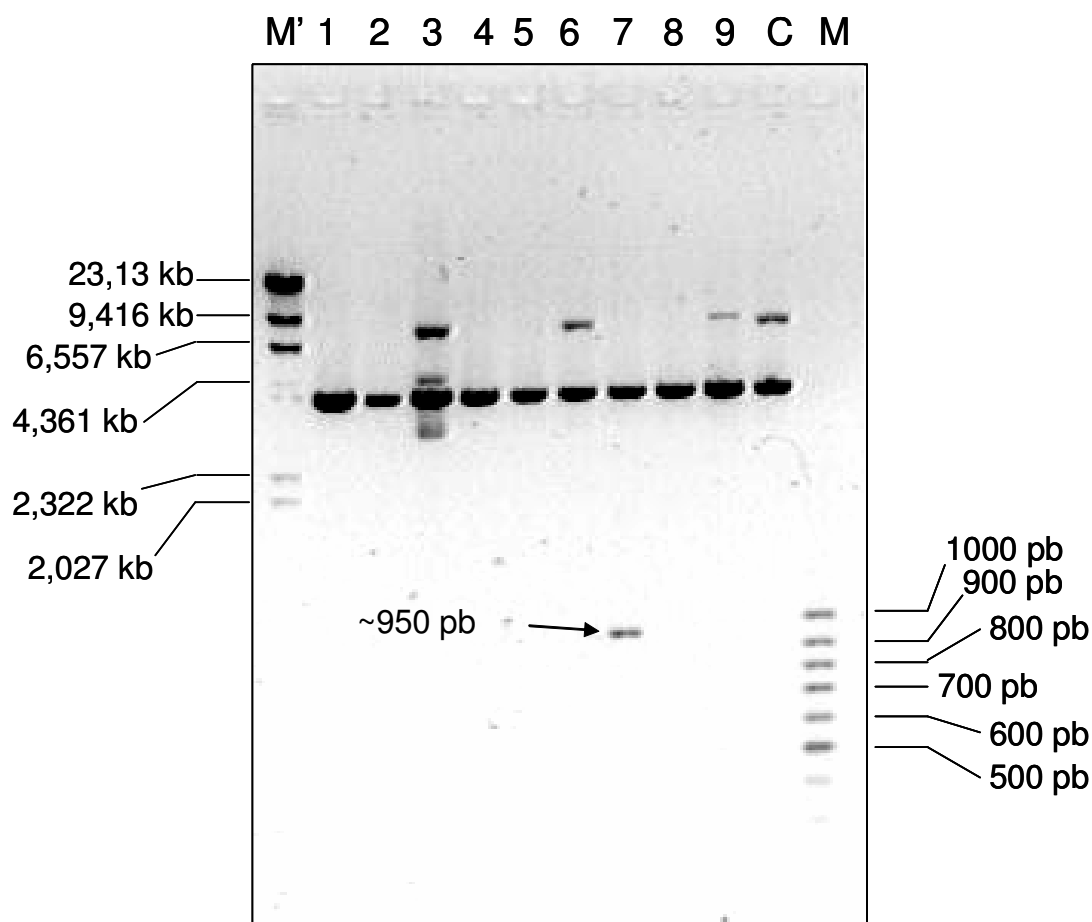


Figura 7: Visualização eletroforética do DNA plasmidial das colônias brancas clivadas com enzima de restrição *Eco* RI, em gel de agarose 1,2 %.

Raia M' – Marcador λ DNA/Hind , raia 1 a 9 – 100 ng de DNA plasmidial de colônias positivas (brancas), raia C – 100 ng de DNA plasmidial de colônia não transformada (azul), raia M – marcador 100 pb Ladder. A seta indica a liberação do fragmento de 950 pb após a digestão do DNA plasmidial com a enzima de restrição.

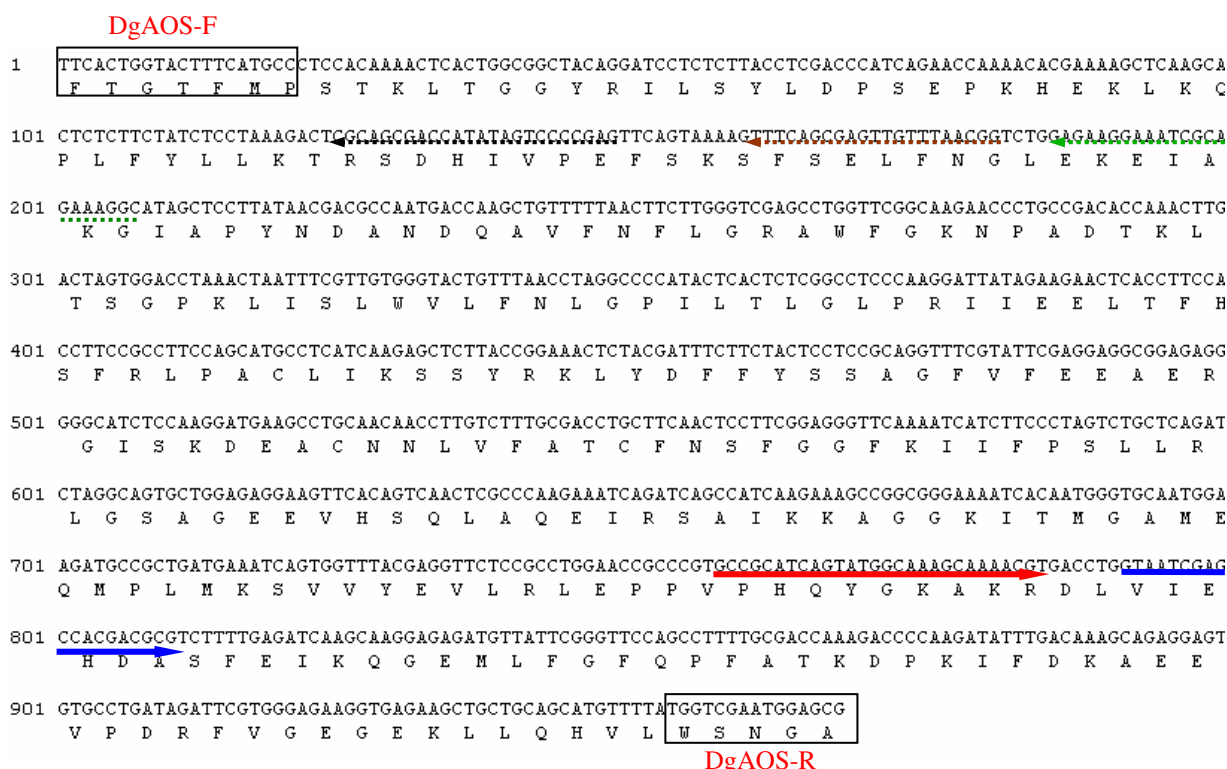


Figura 8: Sequência de nucleotídeos do fragmento de 950 pb do cDNA de AOS de maracujá e a sequência de aminoácidos deduzida da enzima.

Os iniciadores degenerados (DgAOS-F e DgAOS-R) utilizados para a amplificação do fragmento de 950 pb estão representados pelas caixas nas extremidades do fragmento. Essa sequência foi utilizada como modelo na produção de iniciadores específicos para a amplificação das regiões 5' e 3' do cDNA da AOS de maracujá. As setas contínuas indicam as posições de anelamento dos iniciadores AOS3a e AOS3b, situados a uma distância de sobreposição de 100 e 150 pb do iniciador DgAOS-R, respectivamente. As setas pontilhadas representam os iniciadores AOS6r, AOS5r e AOS4r situados a uma distância de sobreposição de aproximadamente 100 pb, 125 pb e 150 pb, respectivamente, do iniciador DgAOS-F. Os números à esquerda correspondem ao número de nucleotídeos da sequência.

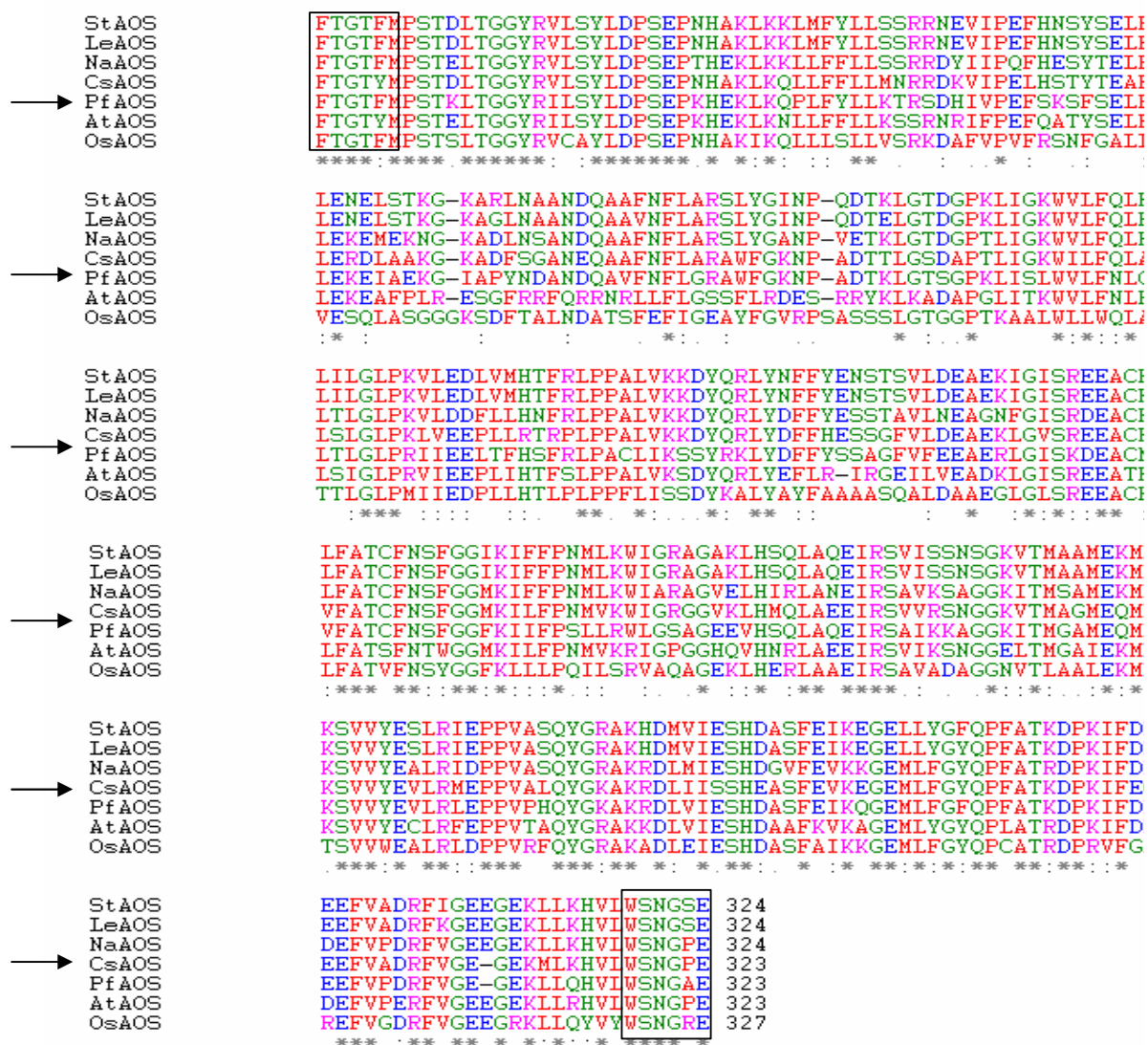


Figura 9: Comparação inicial da sequência de aminoácidos deduzida de cDNA de AOS de plantas.

As seqüências de AOS foram alinhadas usando o programa ClustalW 1.81 disponível na <http://mbcr.bcm.tmc.edu/searchlaucher>. As seqüências de AOS alinhadas foram: StAOS1 (*Solanum tuberosum*, AJ457080.1); LeAOS2 (*Lycopersicon esculentum*, AF230371.1); CsAOS (*Citrus sinensis*, AY243478.1); maracujá (em estudo), AtAOS (*Arabidopsis thaliana*, Y12636) OsAOS1 (*Oriza sativa*, AB116527.1). (*) - indicam resíduos de aminoácidos que são comuns a todas as seqüências alinhadas; (:) indicam resíduos de aminoácidos diferentes, mas com homologia em propriedade química, nas plantas analisadas. As seqüências de aminoácidos que representam os iniciadores utilizados para a amplificação do cDNA, estão marcadas (caixas). (-) espaços incluídos para melhores alinhamentos.

4.4. CLONAGEM DO FRAGMENTO DE cDNA DA REGIÃO 3' DA AOS DO MARACUJÁ

Com a análise da sequência de nucleotídeos do fragmento clonado de 950 pb de PfAOS, iniciadores específicos de uma região de 150 pb (AOS3b) e 100 pb (AOS3a) anterior (*upstream*) a sequência utilizada para a amplificação do fragmento de 950 pb, foram utilizados, juntamente com iniciador oligo dT, em reações de RT-PCR para amplificar fragmentos de tamanhos aproximados de 550 pb e 500 pb, respectivamente, a partir de RNA total extraído de folhas de maracujá tratadas com metil jasmonato por um período de 12 h. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,2%, com a observação de duas bandas de tamanhos aproximados de 500 pb e 550 pb (Fig. 10). O produto de PCR foi clonado em vetor de clonagem pCR 2.1 – TOPO (Invitrogen life technologies) (3.9 kb) e utilizado para transformação de bactérias competentes *E. coli* (TOP10^R). Para minimizar a margem de erro, o fragmento obtido a partir do iniciador AOS3b de 550 pb foi escolhido para submissão ao seqüenciamento, para a análise da sobreposição com o clone de 950 pb, devido ao fato de possuir uma sequência maior para comparação, confirmando a total homologia entre esses resíduos. Da mesma forma, a análise da sequência deduzida de amoníácidos do fragmento amplificado demonstra alta homologia com as AOS de plantas antes utilizadas na comparação com o fragmento de 950 pb (Fig. 11).

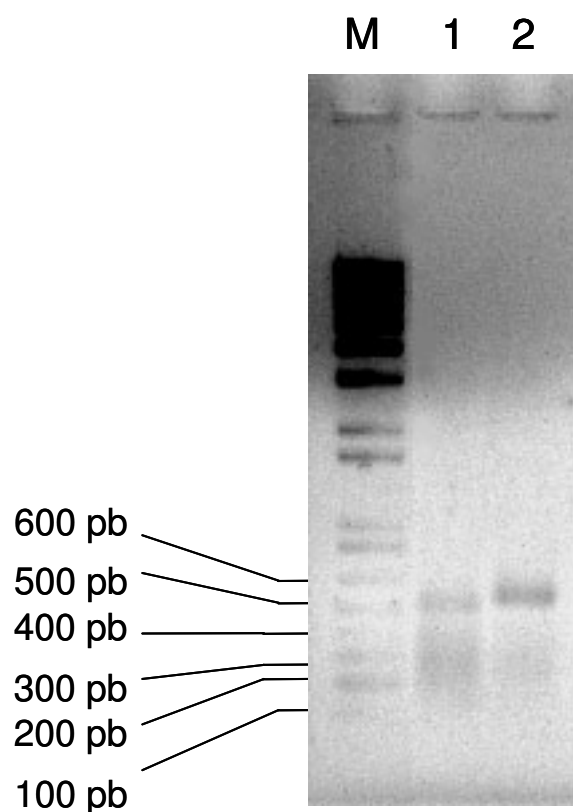
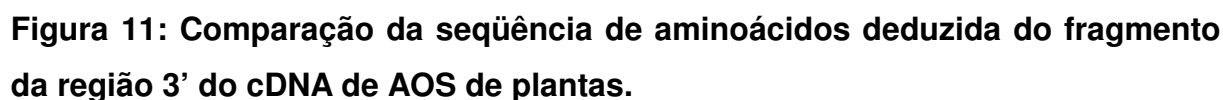


Figura 10: Visualização eletroforética do fragmento da região 3' de cDNA da AOS de maracujá amplificado por RT-PCR, em gel de agarose 1,2 %.

Cada fragmento de cDNA foi obtido por RT-PCR, a partir de RNA total extraído de tecido foliar de plantas tratadas com MJ por 12h. Foram utilizados iniciadores específicos baseando-se na sequência de nucleotídeos do fragmento de 950 pb de PfAOS. Raia M – Marcador 1kb ladder; raia 1 – produto de RT-PCR (2 μ L) obtido da amplificação com a utilização do iniciador AOS3a juntamente com oligo dT; e raia 2 – produto de RT-PCR (2 μ L) da amplificação com a utilização do iniciador AOS3a juntamente com oligo dT.



Siqueira-Junior, C.L.

4.5. CLONAGEM DO FRAGMENTO DE cDNA DA REGIÃO 5' DA AOS DO MARACUJÁ

Três iniciadores específicos foram desenhados a partir da sequência de nucleotídeos do fragmento clonado de 950 pb de PfAOS. Os iniciadores foram produzidos obedecendo uma distância de 150 pb (AOS4r), 125 pb (AOS5r) e 100 pb (AOS5r) posterior (*downstream*) à sequência utilizada para a amplificação do fragmento de 950 pb (DgAOS-F) (Fig. 8), de modo que o produto de PCR possua uma sequência de sobreposição para comparação com o fragmento de 950 pb. Esses iniciadores foram utilizados na técnica RACE 5' para amplificar um fragmento correspondente a região 5' do cDNA da AOS de maracujá, a partir de RNA total extraído de folhas de maracujá tratadas com MJ por um período de 12 h. O produto de amplificação foi fracionado em gel de agarose 1,2%, permitindo a observação de uma banda de aproximadamente 650 pb (Fig. 12). Assim como os demais fragmentos obtidos, esse produto de PCR foi clonado em vetor de clonagem pCR 2.1 – TOPO e utilizado para transformação de bactérias competentes *E. coli* (TOP10^R). O fragmento foi então submetido a seqüenciamento, e a análise da sequência deduzida de aminoácidos também demonstra homologia com as AOS de plantas (Fig. 13).

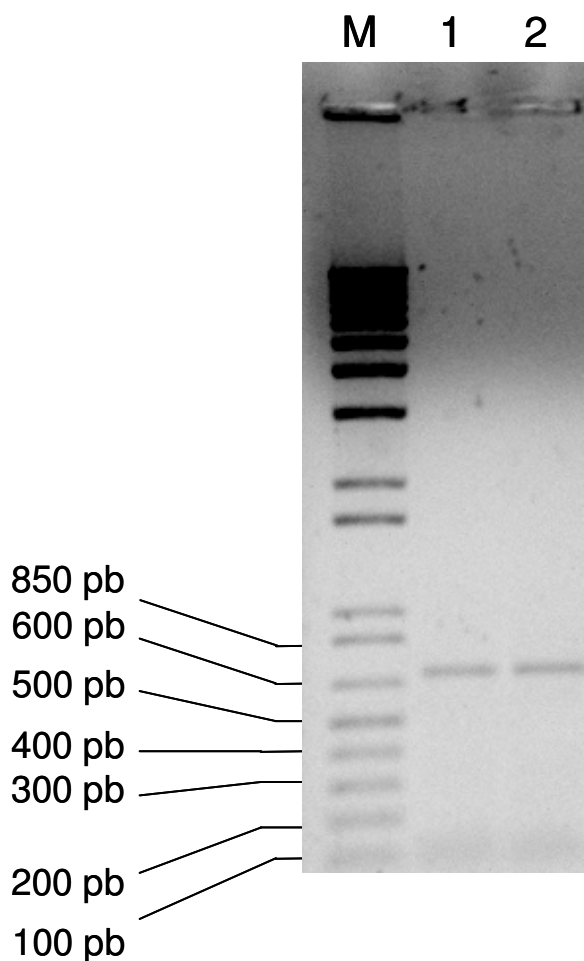


Figura 12: Visualização eletroforética do fragmento da região 5' de cDNA da AOS de maracujá amplificado por RACE 5', em gel de agarose 1,2 %.

O fragmento de cDNA foi obtido por RACE 5', a partir de RNA total extraído de tecido foliar de plantas tratadas com MJ por 12h. Foram utilizados iniciadores específicos baseando-se na sequência de nucleotídeos do fragmento de 950 pb de PfAOS. Raia M – Marcador 1 kb ladder; raia 1 e 2 – produto de PCR (2 μ L) de duas amplificações independentes.

4.6. ANÁLISE DO cDNA TOTAL DA AOS DO MARACUJÁ POR SOBREPOSIÇÃO DOS FRAGMENTOS

Com base na análise das seqüências de nucleotídeos dos fragmentos das regiões 5' e 3' e da região mediana (core) amplificados e clonados, obteve-se a seqüência de nucleotídeos completa do cDNA da AOS, demonstrada na figura 14, onde pode-se observar que o cDNA possui um tamanho total de 1.800 pb, constituído de uma ORF com definidos pontos de início e parada de transcrição de 1.512 pb, uma região 5' não traduzida de 155 pb e uma região 3' não traduzida de 116 pb (excluindo a cauda poliA). Essa ORF quando analisada no programa ProtParam/ExPASy (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) parece codificar uma cadeia polipeptídica com cerca de 504 aminoácidos, com peso molecular calculado de aproximadamente 56 kDa, e ponto isoelétrico 8,39.

A presença de um códon de finalização de tradução (TAA) 48 nucleotídeos na região 5' não codante antes do suposto códon de início da tradução (ATG) indica que o cDNA de PfAOS amplificado contém a seqüência codificadora total (Fig. 14 – sombreamento escuro). Em adição, usando um programa de predição de seqüências, o TargetP v1.01 (ExPASy), a observação da região N-terminal do cDNA de PfAOS revela a presença de uma seqüência de nucleotídeos responsável pela codificação de um peptídeo sinal típico de direcionamento a cloroplastos de 43 aminoácidos (Fig. 14 – seqüência sublinhada).

A seqüência de aminoácidos da PfAOS apresenta uma região que é altamente conservada em proteínas da família dos citocromos P450, que inclui as AOS (Fig. 14 – posição Glu³²⁸ à Asn⁴⁵⁹). Essa região contém domínios importantes para a atividade catalítica de citocromos P450. Em adição, uma cuidadosa análise da região 3' da seqüência de nucleotídeos da PfAOS permite a observação de sítios de poli-adenilação em posições não codificadoras do cDNA antecedendo a seqüência da cauda poli A.

```

1  ggccacgcgctcgactagtagcgaggggggggggataagcacagtgtttgagaagcagctagctgtgagagttgacgaaagtccgcaactcgagttttgc
101  tcaatcaatcagtgagagttctccaaaattttccaataccaatctattttctgtctatGGGCTTCCCAGCAGCCCTCAGAAACAATAATCACAGTCCGTC
    M A S Q Q P S E T T K S Q S V 15
201  CACCCATATCAATGACTCATTATCTGCACCAGCAACCCCTCTCTCCCCAGCGCACCTCTTAAGAGCCCAGCCAGGAAAGTCCCGGAGATTATGGCCTCC
    H P I N D S L S A P A T L P P P A A P S K S P A R K V P G D Y G L 48
301  CTTTCTTTGGTGAATCAGTGACCGTCGGGATTTCTTTTACAACCAAGGCCAAACGAGTTCTTTAAGTCCCGATCCGAAAAATACCAATCAACAGTCTT
    P F F G A I S D R R D F F Y N Q G P N E F F K S R S E K Y Q S T V F 82
401  TAAGCGCAACATGCCACCGAGTCCCTTCATTGCTTCTGACTCAGGAGTAATCGTTTGTGTCGACGGCAAGAGCTTTCCGGTCTCTGTTGAGCTGACGAAA
    K A N M P P G P F I A S D S R V I V L L D G K S F P V L F D V T K 115
501  GTTGAGAAAAAGGACGTTTTCACAGGCACCTTATATGCCCTCCAAAACTCACTGGCGGTACAGGATCCTCTCTTACCTCGACCCATCAGAACCAAAAC
    V E K K D V F T G T Y M P S T K L T G G Y R I L S Y L D P S E P K 148
601  ACGAAAAGCTCAAGCAGCCTCTCTTCTATCTCCTAAAGACTCGCAGCGACCATATAGTCCCCGAGTTCAGTAAAGTTTCAGCAGAGTTGTTTAACGGTCT
    H E K L K Q P L F Y L L K T R S D H I V P E F S K S F S E L F N G L 182
701  GGAGAAGGAAATCGCAGAGAAAGGCATAGTCTCTATAACGACGCCAATGACCAAGCTGTTTTAACTTCTTGGGTCGAGCCTGGTTCGGCAAGAACCTT
    E K E I A E K G I A P Y N D A N D Q A V F N F L G R A W F G K N P 215
801  GCCGACACCAAACTTGGAACTAGTGGACCTAACTAATTTCTGTTGGGTACTGTTTAACCTAGGCCCCATACTCACTCTCGGCCTCCCAAGGATTATAG
    A D T K L G T S G P K L I S L W V L F N L G P I L T L G L P R I I 248
901  AAGAAGTCACTTCCACTCTCTCCGCTTCCAGCATGCCTCATCAAGAGCTCTTACCGGAAACTCTACGATTCTTCTACTCTCCGAGGTTTCGTATT
    E E L T F H S F R L P A C L I K S S Y R K L Y D F F Y S S A G F V F 282
1001 CGAGGAGCGGAGAGGCTGGGCATCTCCAAGGATGAAGCCTGCAACAACCTTGTCTTTGCGACCTGCTTCAACTCCTTCGGAGGGTTCAAAATCATCTTC
    E E A E R L G I S K D E A C N N L V F A T C F N S F G G F K I I F 315
1101 CCTAGTCTGCTCAGATGGCTAGGCAGTGTGGAGAGGAAGTTCACAGTCAACTCGCCCAAGAAATCAGATCAGCCATCAAGAAAGCCGGCGGAAAAATCA
    P S L L R W L G S A G E E V H S Q L A Q E I R S A I K K A G G K I 348
1201 CAATGGGTGAATGGAGCAGATGCCGCTGATGAAATCAGTGGTTTACGAGGTTCTCCGCTGGAACCGCCCGTCCGCGCATCAGTATGGCAAAGCAAAACG
    T M G A M E Q M P L M K S V V Y E V L R L E P P V P H Q Y G K A K R 382
1301 TGACCTGGTAATCGAGAGCCACGACGCTCTTTTGGAGATCAAGCAAGGAGAGATGTTATTCGGGTTCCAGCCTTTTGGCGAACCAAGACCCCAAGATATTT
    D L V I E S H D A S F E I K Q G E M L F G F Q P F A T K D P K I F 415
1401 GACAAAGCAGAGGAGTTTGTCCGTGATAGATTCTGGGAGAAGGTGAGAAGCTGCTGCAGCATGTTTATGGTTCGAACGGGCGGAGACTGAAAGCCCGA
    D K A E E F V P D R F V G E G E K L L Q H V L W S N G P E T E S P 448
1501 CAGTAAGTAACAAGCAATGTGCAGGCAAAACTTCGTGGTATTTGCGTCCAGGCTGTTGCTGCTGATCTGTTTCTACGATACGATACCTTTACCATCGA
    T V S N K Q C A G K N F V V F A S R L F V V D L F L R Y D T F T I E 482
1601 AATTGGTTCCTCCGCTTTGGGGACCGCATCTCTATCAGTCTCTGAAGAAAGCACCAATTGATTCTTAGTttttcaaccaataatctgtctgtcctt
    I G S S A L G T A I S I T S L K K A P I D S * 504
1701 gtaaatgctgggtttccagcttgggatcatcttggattccatgcataaatttcgtcttttattttaaaaaaaaaacatttatctggaaaaaaaaaaaaaa
1801 aaaaaaa

```

Figura 14: Seqüência completa do cDNA da AOS de maracujá.

São mostradas a seqüência de cDNA e a seqüência deduzida de aminoácidos numerados na esquerda e direita, respectivamente. (*) representa o códon de parada da tradução. As seqüências demarcadas com caixas representam os supostos sítios de poliadenilação encontrados na região 3' não traduzida. A região sombreada clara representa o domínio conservado em proteínas da família dos citocromos P450. Os resíduos de aminoácidos que constituem a seqüência do peptídeo de direcionamento para cloroplasto está sublinhada. A seqüência sombreada escura representa um códon de terminação, demonstrando que o clone obtido é o cDNA total da AOS.

4.7. ANÁLISE DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE AS AOS DE PLANTAS E IDENTIFICAÇÃO COMO UMA ENZIMA DA SUBFAMÍLIA CYP74A DE CITOCROMOS P450

A seqüência deduzida de aminoácidos de cDNA total *PfAOS*, demonstrada na figura 14, foi comparada com as seqüências de aminoácidos de AOS de outras plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas. A análise comparativa, mostrada na figura 15, revelou que a proteína de 504 aminoácidos apresenta homologia máxima de 68% com a AOS1 de batata (*StAOS1*, AJ457080.1), seguida de 67% com AOS de laranja (*CsAOS*, AY243478.1), tabaco (*NaAOS*; AJ295274.1) e linho (*LuAOS*, U00428). Uma AOS produzida em tomate (*LeAOS2*, AF230371) compartilha 66% de homologia em seqüência com a *PfAOS*; enquanto que a AOS de guaiule (*PaAOS*, X78166.1) compartilha 65% de homologia. A *PfAOS* apresenta menor homologia em seqüência com proteínas AOS de monocotiledôneas, como por exemplo: uma homologia de 56% com as AOS encontradas em arroz (*OsAOS1*, AB116527.1; *OsAOS2*, AY062258.1) e de 55% com uma AOS de cevada (*HvAOS1*, AJ250864.1).

Após análise com o programa ChloroP v 1.1, foi confirmada a presença de um resíduo de 43 aminoácidos na região N-terminal que constituem um peptídeo-sinal de direcionamento a cloroplastos (Fig. 15).

Uma árvore filogenética, construída a partir da homologia da seqüência total de *PfAOS* com outras AOS de plantas revela que a AOS de maracujá compartilha uma origem evolutiva comum com as AOS de uma espécie de cucurbitáceas e que, portanto foi agrupada juntamente com a AOS de melão (*CmAOS*) (Fig. 16, *PfAOS* está em negrito). Em adição a árvore mostra que a AOS de maracujá tem origem evolutiva bem próxima de proteínas AOS de plantas monocotiledôneas de espécies de Poaceas como a AOS de arroz (*OsAOS*), cevada (*HvAOS*) e milho (*ZmAOS*).

Um dos padrões mais definidos de AOS é a presença de domínios conservados em citocromos P450, e a *PfAOS* possui todos eles. Esses domínios estão presentes na região C terminal da seqüência deduzida de *PfAOS* (Fig.15). Um desses domínios apresenta-se como uma seqüência conservada P-V-NKQCAG de ligação a grupo heme presente em todas as enzimas da subfamília CYP74A que é uma variação do sítio FXXGXXXCXG encontrado na maioria das proteínas da família dos citocromos P450. Outra seqüência conservada GXXXT denominada de

domínio “I Helix”, que nas AOS geralmente é encontrada na forma -G-KILF, na *PfAOS* está presente com uma variação -G-KIIF, onde o resíduo de Lis é substituído por um de Ile. As enzimas AOS são conhecidas por apresentarem um outro domínio conservado denominado “ETLR” (“K hélix”) que está presente como EVLR na posição 365 da cadeia polipeptídica da AOS de maracujá.

Análises filogenéticas foram feitas para demonstrar uma relação funcional entre a *PfAOS* e outros membros da subfamília CYP74, que é dividida em quatro subfamílias distintas. Uma árvore filogenética sem raiz foi então construída indicando a classificação da AOS de maracujá como uma proteína da subfamília CYP74A, na qual estão classificadas outras AOS de plantas as quais possuem grande especificidade para 13-hidroperóxidos (Fig. 17). A *PfAOS* mostrou maior similaridade evolutiva com as AOS de linho e guaiule (*LuAOS* e *PaAOS*, respectivamente).

Figura 15: Comparação da seqüência de aminoácidos das proteínas AOS de plantas com a seqüência de 504 aminoácidos deduzida a partir do cDNA .

As seqüências de AOS foram alinhadas usando o programa ClustalW 1.81 disponível na <http://mbcr.bcm.tmc.edu/searchlauchner>. As seqüências de AOS alinhadas foram: maracujá (em estudo), AtAOS (*Arabidopsis thaliana*, Y12636); CsAOS (*Citrus sinensis*, AY243478.1); HvAOS1 (*Hordeum vulgare*, AJ250864.1); LeAOS2 (*Lycopersicon esculentum*, AF230371.1); LuAOS (*Linum usitatissimum*, U00428.1); NaAOS (*Nicotiana attenuate*, AJ295274.1); OsAOS1 (*Oryza sativa*, AB116527.1); PaAOS (*Parthenium argentatum*, X78166.1) e StAOS1 (*Solanum tuberosum*, AJ457080.1). (-) espaços foram incluídos para otimizar o alinhamento. (*) indicam resíduos de aminoácidos que são comuns a todas as seqüências alinhadas; (:) indicam resíduos de aminoácidos diferentes, mas com homologia em propriedade química, nas plantas analisadas. Os nucleotídeos demarcados por sublinhamento duplo representam a seqüência de direcionamento para cloroplasto. Os domínios conservados na seqüência estão demarcados: um sítio de ligação a grupamento heme (com o resíduo de cisteína marcado pelo símbolo #); o domínio “I Helix” (GXXXT) e o domínio “K-Helix” (ETLR) altamente conservados na subfamília CYP74A dos citocromos P450. As caixas, em vermelho, representam os iniciadores degenerados utilizados para a obtenção do fragmento de 950 pb (core).



PfaOS	1	-----MASOQPSETTKSOSVHPINDSL-----APATLPPPAAPSKSPARKVPGDYGLPFFGAIISDR
AtaOS	1	-----MASISTFPFISLHPKTVRSKPLKFR-VLTRPIKASGSETPDLTVATR-----TGSKDLPIRNIPGNYGLPIVGP IKDR
CsaOS	1	-----MASTSLSFSLLPTEFQSPKRSSKLYTPRVRSAAIRPRPIIASISEKQSVVPPPIIISPSDEQPTKLP IRKIPGSGYGLPYLGP IKDR
HvaOS1	1	-----MNQSGMARS-----DEGSIVPREVPGSYGLPFVSAIRDR
LeaOS2	1	-----MALTL-SFSLPLPSLHQKIPSKYST-----FRPIIVSLSDKS-----TIEIT-----QPIKLSRTIPGDYGLPGIGPWKDR
LuAOS	1	MASSALNNLVAVNPTLSPSPKSTPLPNTFSLNRRVSAFRPIKASLFGDSDPIKIPGITSQPPSSDETTLPIRQIPGDYGLPGIGPIQDR
NaAOS	1	-----MAVATATATLSS-SSSLPFHSLHQQFP SKYT-----VRPITVSLSEKIPAVTQSS-----EFTKLPIRTIPGDYGLPLIGPWKDR
OsaOS1	1	-----MATAAACISFASP SPARVVIRQTR-----ASASASATDRQEVVSP-----KRRRLPRKVPGDYGPVVGAIRDR
PaAOS	1	-----MDPSSKPLREIPGSGYGPFPFQPIKDR
StAOS1	1	-----MASTSLSLPSLKLQFP SHKSSSRKNSSSHRSIRPIQASVSERPPIYISSPSPSPSP-----VKQAKLPTRKVPGDYGLPLVGPWKDR
	1	* :*: * * . . . **
PfaOS	58	RDFYFNQG-PNEFFKSRSEKYQSTVFKANMPPGPFIIASDSRVIVLLDGKSFVFLFDVTKVEKKDFTGTGTYMSTELTGGRYRILSYLDPSE
AtaOS	73	WDYFYDQG-AEEFFKSRIRKYNSTVYRVNMPPGAFIAENQVVALLDGKSFVFLFDVTKVEKKDFTGTGTYMSTELTGGRYRILSYLDPSE
CsaOS	88	QDYFYNLG-RDEFFKSKIQKYGSTVFRANMPPGPFIISSNPKVIVLLDGKSFVFLFDVSKVEKKDFTGTGTYMSTDLTGGRYRILSYLDPSE
HvaOS1	35	LDFYYFQG-QDKYFESRVEKYGSTVVRINVPPGPFMARDPRVAVSLDAKSFVFLFDVTKVEKKDFTGTGTYMSTDLTGGRYRILSYLDPSE
LeaOS2	67	LDYFYFNQG-KNDFESRIAKYKSTIFRTNMPPGPFITSNPKVIVLLDGKSFVFLFDASKVEKKDFTGTGTYMSTELTGGRYRILSYLDPSE
LuAOS	91	LDYFYFNQG-REEFFKSRLOKYKSTVYRANMPPGPFIIASNPRIIVLLDAKSFVFLFDMSKVEKKDFTGTGTYMSTELTGGRYRILSYLDPSE
NaAOS	76	QDYFYFNQG-KEEFFRSRIQKYKSTVFKTNMPPGPFIISSNPVIVLLDGKSFVFLFDVSKVEKKDFTGTGTYMSTELTGGRYRILSYLDPSE
OsaOS1	66	YEYFYGPGGDRGFAARVRAHRSTVVRNMPGPFIVARDPRVALLDAASFPVFLDTSVLVDKTLTGTGTYMSTDLTGGRYRILSYLDPSE
PaAOS	27	LEYFYGTGGDRDEYFRSRMQYQSTVFRANMPPGPFVSSNPKVIVLLDAKSFVFLFDVSKVEKKDFTGTGTYMSTKLTKGAYRILSYLDPSE
StAOS1	85	LDYFYFNQG-KNEFFKSRIOKHQSTVFRANMPPGPFISFNPVIVLLDGKSFVFLFDVSKVEKKDFTGTGTYMSTDLTGGRYRILSYLDPSE
	9	:*: * : * : : *: : * :*: * : : . :*: * : . . . **
PfaOS	147	PKHEKLNKQLFLYLLKTRSDHIVPEFSKSFSEFNGLKEKIAEKGIAPYNDANDQAVFNF LGRAWFGKNPADTKLGTSGPKLISLWVLFNL
AtaOS	162	PKHEKLNKLLFFLLKSSNRNRIPEFQATYSELDFSLEKELSLGKADFGGSSDGTAFNFLARAFYGTNPADTKLKADAPGLITKWVLFNL
CsaOS	177	PNHAKLQLLFFLLMNRRDKVPELHSTYTEAFETLERDLAAKGADFGSANEQAANFLARAFGKNPADTKLGSAPTLIGKWLIFNL
HvaOS1	124	PTHTKVKQLFLSLLASRKDAFIPAFRSHESSLLATVESQLLLSGKSNFNTLNDATSFEEIGDGYFVLPSASDLGTTGPAKAACKWLIFNL
LeaOS2	156	PNHEKLNKLLMFFLLSSRRDHVPEFHETYTELFTLDKMEKEKGTGVFNSSGDAQANFLARSFVGPNVETKLGTDPALIGKWLIFNL
LuAOS	180	PNHAKLQLLFFLLMNRRDYVPEFSSSDTLCEDVEYDILAKGAAFNDAEQAAANFLARSFVGPNVETKLGTDPALIGKWLIFNL
NaAOS	165	PHEKLNKLLFFLLSSRRDYIIPQFHESTYELFTLEKMEKKGADLNSANDQAANFLARSFVGPNVETKLGTDPALIGKWLIFNL
OsaOS1	156	PNHAKLQLLFFLLSSRRQVQVVPKFRVYDGLFGLMENDLAKGADFGVHNDAAAFGLCQGLLGRDPAKSLGRDGPKLITKWVLFNL
PaAOS	117	PRHAQLKLNLLFFMLKNSSNRVIPQFETTYTELFEGLEAEAKNGKAANFVGEQAANFLARSFVGPNVETKLGTDPALIGKWLIFNL
StAOS1	174	PNHAKLQLLFFLLSSRRNEVPEFHNSYSELFTLENELSTGKARLNAANDQAANFLARSFVGPNVETKLGTDPALIGKWLIFNL
	71	* * : * : : : . : * : : : : : * : : : * : . . . * : * : * : : *
PfaOS	237	GPILTGLPRIIEELTFHSFRLPACLIKSSYRKLIDFFYSSAGFVFEEAERLGISKDEACNNLVATCFNSFGGFKIIFPSLLRWLGSAG
AtaOS	252	HPLLSIGLPRVIEEPLIHTFSLPPALVKSDYQRLYEFFLESAGEILVEADKLGISREEATHNLLFATCFNTWGGMKILFPNMVKWIGRAG
CsaOS	267	APLLSIGLPLKVEEPLLRTRPLPALVKDQYQRLYDFFHSSSGFVLDEAEKLGVSREEACHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
HvaOS1	214	HPVLTLGLPMILEEPLLHTVHLPPFLVSGDYKALYKYFFAAATKALDTAEGGLKRDACHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
LeaOS2	246	HPVITGLPKFLDDVLLHTFRLPPLVKKDYQRLYDFFYTNANLFLAEKLGISKDEACHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
LuAOS	270	APILSVGLPKVEEATLHVSRLPPLLVQNDYHRLYEFTTAAAGSVLDEAEQSGISRDEACHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
NaAOS	255	HPLLTLGLPKVLDLFLHNLRLPALVKDQYQRLYDFFYESTAVLNEAGNFGISRDEACHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
OsaOS1	246	SPLLSIGLPLVEDTLHSLRLPALVKDQYQRLYDFFYESTAVLNEAGNFGISRDEACHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
PaAOS	207	APTLDLGLPWFLOEPLHTFRLPAFLIKSTYNKLYDQSVATPVMEQAEKLGKDEAVHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
StAOS1	264	HPLLILGLPKVLEDLVMHTFRLPALVKDQYQRLYDFFYESTAVLNEAGNFGISRDEACHNLVATCFNSFGGFKILFPNMVKWIGRAG
	102	* :*: * : : : . . . **
PfaOS	327	EEVHSQLAQEIRSAIKKAG-GKITMGAEQMPLMKSVVYEVRLPEPPVPHQYGAARDLVIESHDAFIEIKQGEMLFGYQPFATKDPKIF
AtaOS	342	HQVHNRLAAEIRSVIKSNG-GELTMGAIEKMELTKSVVYECLEFEPVTAQYGRAKKDLVIESHDAFIEIKQGEMLFGYQPFATKDPKIF
CsaOS	357	VKLHMLAQEIRSVVRSNG-GKVTMAGMEQMPLMKSVVYEVRLMEPPVALQYGAARDLIISSHEASFVEKGEMLFGYQPFATKDPKIF
HvaOS1	304	EKFHKKLVTEIRAAVAEAG-GKVTIEALEKMELTKSAVWEALRLDPAVKFYGRAKADNMIESHDAFIEIKQGEMLFGYQPFATKDPKIF
LeaOS2	336	VEIHTRLANEIRSEVKSAG-GKITMSAMEKMPLMKSVVYEAALRVDPPVASQYGRAKQDLKIESHDAFIEIKQGEMLFGYQPFATKDPKIF
LuAOS	360	LELHTKLAQEIRSAIQSTGGGKVMAAMEQMPLMKSVVYETLRIEPPVALQYGAARDLIISSHEASFVEKGEMLFGYQPFATKDPKIF
NaAOS	345	VELHIRLANEIRSAVKSAG-GKITMSAMEKMPVMKSVVYEAALRIDPPVASQYGRAKADNMIESHDAFIEIKQGEMLFGYQPFATKDPKIF
OsaOS1	336	ARVHGLRATLAVRGAVRDNG-GEVTMKALAEMLVKSAYVEALRIEPPVAMQYGRAKADNMIESHDAFIEIKQGEMLFGYQPFATKDPKIF
PaAOS	297	ENLHTQLAAEIRGAIKSYGDNVTLEAIEQMPMTKSVVYESLRIEPPVPPQYGAARDLIISSHEASFVEKGEMLFGYQPFATKDPKIF
StAOS1	354	AKLHSQLAQEIRSVISSNS-GKVTMAAMEKMPLMKSVVYESLRIEPPVPPQYGAARDLIISSHEASFVEKGEMLFGYQPFATKDPKIF
	148	. : * : * : * : . . . * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PfaOS	416	D-KAEFFVDRFVGE-GEKLLQHVLVNSNGPETESPTVSNKQACAGNFVVFASRLFVVDLFLRYDFTTIEIGSSALGTAISITSLKKAPID
AtaOS	431	D-RADEFVDRFVGE-GEKLLRHVLVNSNGPETETPTVGNKQACAGKDFVVLVARLFVIEIFRRYDSFDIEVGTSPLGSSVNFSSLRKASF-
CsaOS	446	E-QAEFFVDRFVGE-GEKMLKHVLVNSNGPETENPPVGNKQACAGKDFVVLASRLLLVFLFLRYDSFDIQGKSAIGSSVTLTSLKRASF-
HvaOS1	393	GPTAREFVDRFVGEKESKLLKYVINSNGRETESPSVHNKQCPGKNLVVLVGRLLVVELFLRYDFTTAKVGLDLLGKVEFTGVTKATSG
LeaOS2	425	D-RPEEFVDRFVGE-GEKLLKHVLVNSNGPETESPTVGNKQACAGKDFVVMVSRFVTEFFFLRYGTINVDVGTSLGSSITITSLKKA---
LuAOS	450	D-RPEEFVDRFVGE-GVKLMYVMSNGPETETPSVANKQACAGKDFVVMVSRFVTEFFFLRYGTINVDVGTSLGSSITITSLKKA---
NaAOS	434	D-RPEEFVDRFVGE-GEKLLKHVLVNSNGPETESPTVENKQACAGKDFVVLVSRLLVTEFFFLRYDFTLIDVGTSPLGAKITITSLKRA---
OsaOS1	425	A-RPEEFVDRFLGEDGARLLRHVLVNSNGPETEAPTILHDKQACAGKDFVVLVARLLVVELFLRYDSFDIEVGTSTLGSSVTVTSLKATF-
PaAOS	387	D-RPEEFVDRFVGD-GEALLKYVMSNGPETETENPSINNQACAGKDFVVLVSRLLVVELFLRYDSFDIEVGTSTLGSSVTVTSLKATF-
StAOS1	443	D-RSEEFVDRFVGE-GEKLLKHVLVNSNGPETENPSINNQACAGKDFVVLVSRLLVVELFLRYDSFDIEVGTSTLGSSVTVTSLKATF-
	206	. : * : * : * : . . . * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PfaOS	504	S-----
AtaOS	518	-----
CsaOS	532	-----
HvaOS1	483	VADAV
LeaOS2	510	-----
LuAOS	536	-----
NaAOS	519	-----
OsaOS1	512	-----
PaAOS	473	-----
StAOS1	530	-----

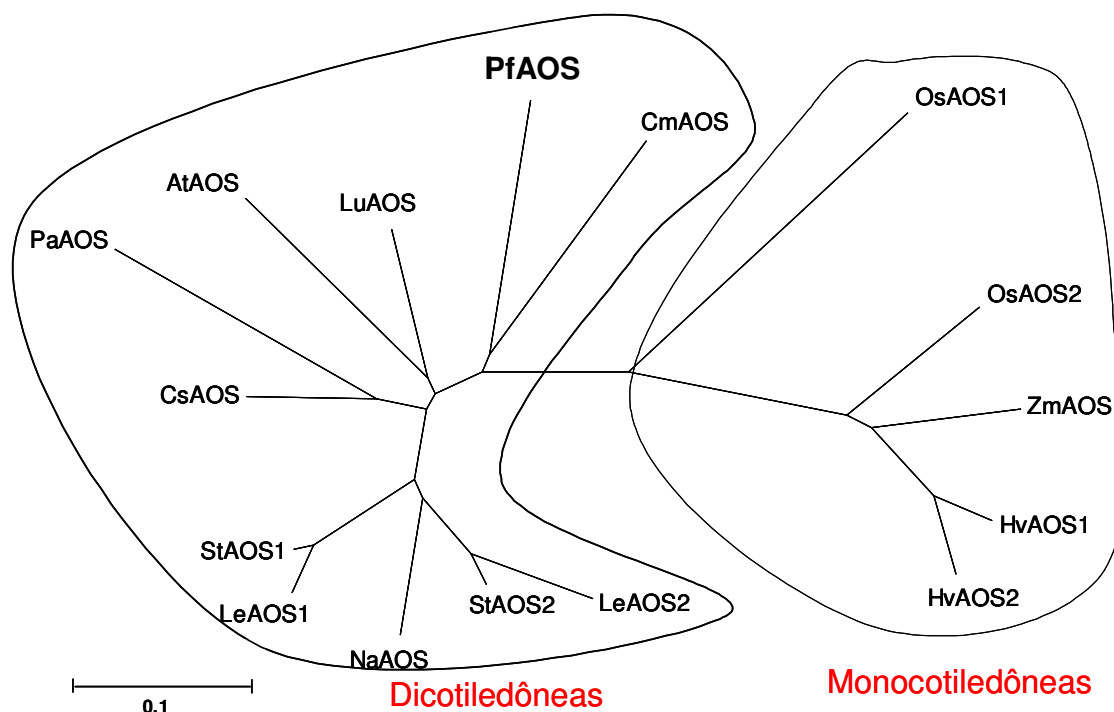
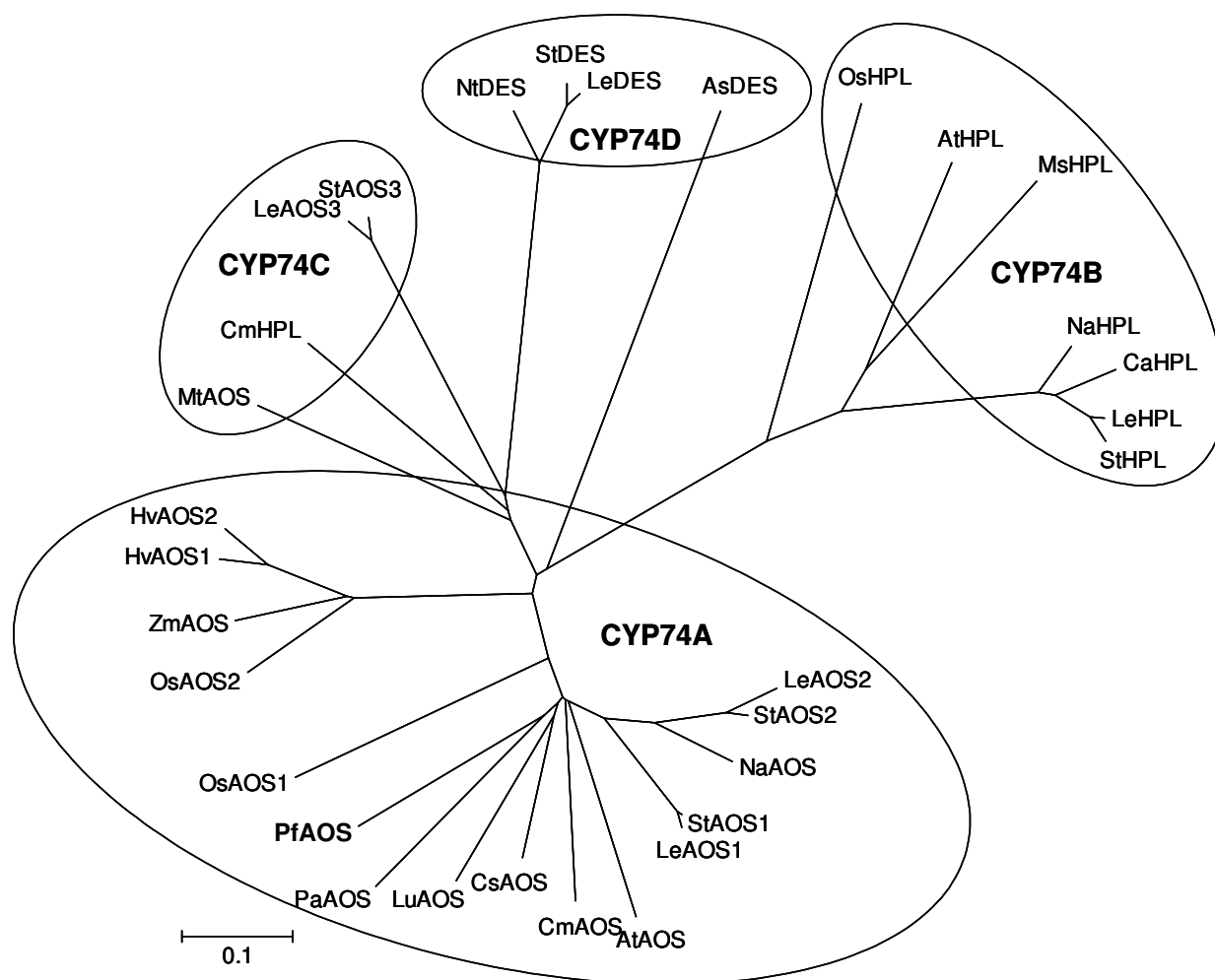


Figura 16: Árvore filogenética sem raiz de proteínas AOS preditas ou conhecidas de plantas.

Os números de acesso das seqüências são precedidos de um código de duas letras, que referem-se a espécie da qual a proteína foi identificada, seguidos do termo AOS. StAOS1 (AJ457080), StAOS2 (AJ457081), *Solanum tuberosum*; LeAOS1 (AJ271093), LeAOS2 (AF230371), *Lycopersicon esculentum*; NaAOS (AJ295274), *Nicotiana attenuata*; CmAOS (AF081954), *Cucumis melo*; HvAOS1 (AJ250864), HvAOS2 (AJ251304), *Hordeum vulgare*; ZmAOS (AY488135), *Zea mays*; OsAOS1 (AB116527), OsAOS2 (AY062258), *Oryza sativa*; CsAOS (AY243478.1), *Citrus sinensis*; AtAOS (Y12636), *Arabidopsis thaliana*; LuAOS (U00428), *Linum usitatissimum*; PaAOS (X78166), *Parthenium argentatum*; PfAOS (EF601088), *Passiflora flavicarpa*.

Figura 17: Árvore filogenética sem raiz de proteínas da subfamília CYP74 de citocromos P450.

Os grupos delimitados por círculos indicam as quatro subfamílias de CYP74. Os números de acesso das seqüências são precedidos de um código de duas letras, que referem-se a espécie da qual a proteína foi identificada, seguidos do termo AOS. StAOS1 (AJ457080), StAOS2 (AJ457081), StAOS3 (DQ174273), StHPL (AJ310520), StDES (AJ309541) *Solanum tuberosum*; LeAOS1 (AJ271093), LeAOS2 (AF230371), LeAOS3 (AF454634), LeHPL (AF230372), LeDES (AF230372), *Lycopersicon esculentum*; NaAOS (AJ295274), NaHPL (AJ414400), *Nicotiana attenuata*; CmAOS (AF081954), CmHPL (AF081955), *Cucumis melo*; HvAOS1 (AJ250864), HvAOS2 (AJ251304), *Hordeum vulgare*; ZmAOS (AY488135), *Zea mays*; OsAOS1 (AB116527), OsAOS2 (AY062258), OsHPL (AY340220), *Oriza sativa*; CsAOS (AY243478.1), *Citrus sinensis*; AtAOS (Y12636), AtHPL (AF087932), *Arabidopsis thaliana*; LuAOS (U00428), *Linum usitatissimum*; PaAOS (X78166), *Parthenium argentatum*; PfAOS (EF601088), *Passiflora flavicarpa*; MtAOS (AJ316561.1), *Medicago trunculata*; MsHPL (AJ249246), *Medicago sativa*; CaHPL (U51674), *Capsicum annuum*; NtDES (AF070976), *Nicotiana tabacum*; AsDES (AJ867809), *Allium sativum*.



4.8. LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DA PROTEÍNA AOS PRODUZIDA EM FOLHAS DE MARACUJÁ

A análise de cortes ultra-finos de folhas de maracujá, tratadas com MJ, e incubadas com anticorpos produzidos contra a AOS de tomate, revelou que a AOS (marcada com partículas de ouro coloidal de 10 nm) está localizada no estroma dos cloroplastos e nas membranas dos tilacóides (Fig. 18 – A e B). Análises feitas, substituindo-se o soro imune por soro pré-imune, não demonstram nenhuma marcação no corte (Fig. 18 – D). O mesmo ocorre quando cortes de plantas controle (não tratadas) são incubadas com soro imune contendo os anticorpos contra a AOS (Fig. 18 – C).

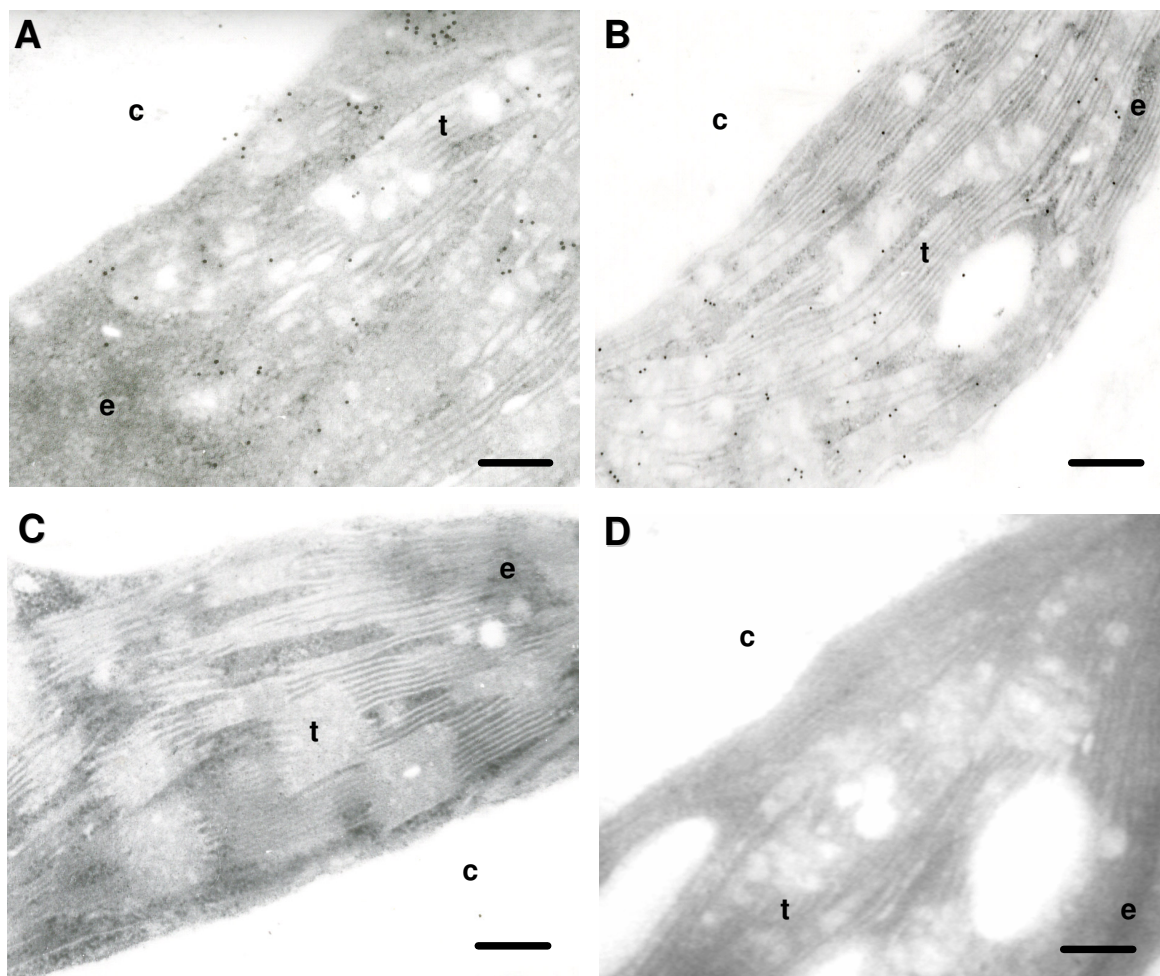


Figura 18: Imunolocalização da AOS em cortes de folhas de maracujá.

A e B) Cortes de folhas coletadas 24 h após tratamento com MJ incubados com soro imune contendo anticorpos contra a AOS (barras correspondem a um tamanho estimado de 150 μm e 250 μm , respectivamente); **C)** corte de folha controle (não tratadas) incubadas com v a um tamanho estimado de 150 μm ; **D)** corte de folha coletadas 24 h após tratamento com MJ incubados com soro pré-imune (barra corresponde a um tamanho estimado de 150 μm). As letras localizadas nas estruturas representam: c – citosol, t – tilacóides, e – estroma.

4.9. ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE AOS EM FOLHAS DE MARACUJÁ EM RESPOSTA A FERIMENTO MECÂNICO E TRATAMENTO COM METIL JASMONATO

Análises por “northern blot” foram empregadas para investigar a expressão de AOS em resposta a ferimento e tratamento de plantas com MJ (Fig. 19). Como resultado, foi verificado que após o ferimento mecânico, provocado com pinças de hemostato, transcritos de AOS se acumularam seguidos 30 min após tratamento. A expressão do gene induzida por ferimento tem seu pico máximo em 9 h, declinando a níveis menores após 12 h (Fig. 19 – painel ferimento). As folhas não feridas adjacentes àquelas tratadas também foram analisadas em relação à expressão sistêmica do gene da AOS. Foi então observado que as folhas sistêmicas também apresentam um acúmulo de transcritos de AOS, seguidos 30 min após o tratamento (Fig. 19 – painel sistêmico). Contudo, o pico máximo de expressão ocorre 12 h após o tratamento e declina passadas 24 h. Quando tratadas com MJ as folhas apresentam um padrão de expressão mais intenso, acarretando uma indução da transcrição após 30 min e elevando drasticamente os níveis de transcritos de AOS após 3h (Fig. 19 – painel MJ). Esse acúmulo, além de mais intenso, que o provocado por ferimento mecânico, ainda é mais duradouro, se mantendo mesmo após as 24 h após o tratamento.

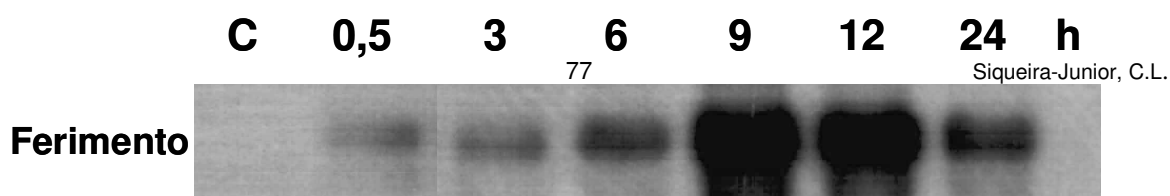


Figura 19: Análise da expressão do gene codificador de AOS em folhas de maracujá por “northern blot”.

RNA total de tecido foliar foi extraído nos tempos indicados; (C) representa o RNA extraído de plantas controle (não tratadas). Foram analisados 15 µg de RNA de cada amostra. Como controle de quantidade aplicada, foi utilizada uma fotografia do gel de RNA corado com Brometo de etídeo.

4.10. ANÁLISE DO GENE CODIFICADOR DE AOS DE MARACUJÁ POR “SOUTHERN BLOT”

A análise genômica do DNA de folhas de maracujá utilizando-se como sonda o fragmento de cDNA de 950 pb como sonda, em experimentos de “southern blot”, revelaram um simples padrão de hibridização com cada uma das enzimas de restrição utilizadas (Fig. 20). Como pode ser observado, ocorre um padrão de hibridização simples indicando que o cDNA da PfAOS pode ser derivado de uma única cópia gênica (Fig.20).

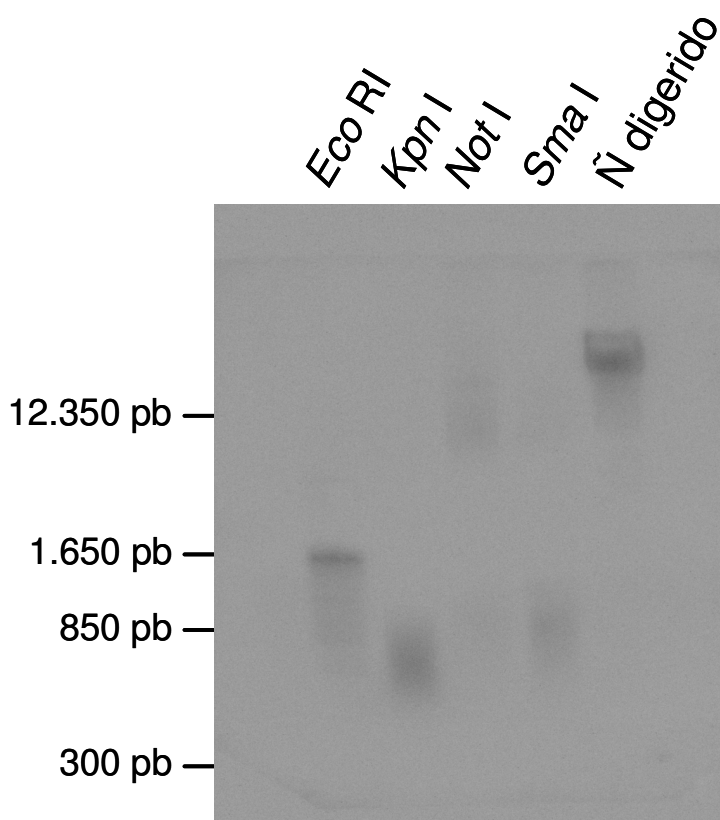


Figura 20: Análise do gene codificador de AOS de maracujá por “southern blot”. DNA genômico de maracujá foi extraído e digerido com as enzimas de restrição *EcoRI*, *KpnI*, *NotI* e *SmaI*. *Ñ diregido* – DNA genômico não digerido com enzima de restrição (controle). A membrana contendo DNA digerido foi hibridizada por sondas, marcadas radioativamente, derivadas do fragmento de 950 pb do cDNA de PfAOS. O padrão de peso molecular utilizado (1Kb ladder plus) está indicado a esquerda, onde apenas alguns foram evidenciados.

4.11. INDUÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASE CISTEÍNICA EM FOLHAS DE MARACUJÁ EM RESPOSTA A INDUÇÃO DE AOS

Plantas de maracujá foram analisadas quanto a produção de inibidores de proteinase cisteínica, uma vez que esse inibidores constituem um dos produtos da rota do octadecanóide. Para esse fim, extratos brutos foliares de plantas de maracujá feridas e tratadas com MJ por 24 h foram analisados por SDS-PAGE e “western blot” (Fig. 21B). A análise da imunodeteção revela a indução de uma proteína de cerca de 60 kDa, não detectada nas plantas controle, que reage com anticorpos produzidos contra cistatina do tomate, em folhas de plantas de maracujá após o ferimento mecânico (Fig. 21B, raia 2). Além disso, plantas tratadas com MJ, apresentam a indução de outras duas proteínas, que também reagem com o anticorpo utilizado (Fig. 21B, raia 4). Os extratos foram então submetidos a análise de atividade inibitória de papaína através de ensaios espectrofotométricos que reforçaram a idéia da indução de inibidores de proteinase cisteínica, em folhas de plantas de maracujá em resposta a ferimento e tratamento com MJ (Fig. 21A). Como pode ser observado, a atividade proteolítica da papaína declina cerca de 75% quando a enzima é incubada com extrato bruto foliar de plantas feridas. Observa-se ainda que a indução é sistêmica, uma vez a adição extrato derivado de folhas não feridas adjacentes as folhas tratadas no ensaio também provoca a inibição da atividade de papaína da ordem de ~70%. A inibição máxima foi alcançada com a incubação da papaína com extrato derivado de folhas tratadas com MJ, que levaram a redução de aproximadamente 80% da atividade da enzima. Uma inibição de cerca de 25% foi verificada após a incubação de papaína com extrato bruto foliar de plantas controle (não tratadas), apesar de nenhuma banda protéica imunoreativa ter sido observada nos experimentos de “western blot” (fig. 21B – raia 1).

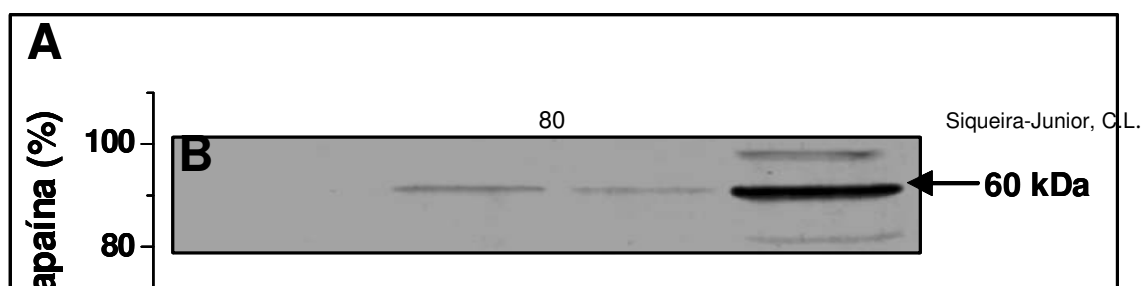


Figura 21: Indução de inibidores de proteinase cisteínica em folhas de maracujá.

A) Análise da atividade inibitória de uma cistatina induzida em folhas de maracujá contra a papaína, utilizando-se BANA como substrato. Para cada tratamento foram incubados 70 µg de extrato bruto foliar combinados com 1 mg de papaína. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os dados representam uma média de três experimentos independentes, onde o desvio padrão foi menor que 7% em todos os casos. **B)** Análise por “western blot” da indução de cistatina em folhas de maracujá. 80 µg de proteína total foram fracionados em SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram incubadas com soro imune contendo anticorpo policlonais produzidos contra cistatina do tomate (diluído 1:5.000).

5. DISCUSSÃO

5.1.INDUÇÃO DE UMA PROTEÍNA IMUNO RELACIONADA A AOS EM PLANTAS DE MARACUJÁ COM ATIVIDADE METABOLIZADORA DE HIDROPERÓXIDOS.

Recentemente, nosso grupo verificou a atividade de 13-lipoxigenases em folhas de plantas de maracujá após ferimento mecânico e tratamento com MJ (Rangel *et al.*, 2002). As atividade das lipoxigenases compreendem a etapa inicial da via das lipoxigenases (Fig. 3). De acordo com a rota biossintética dos jasmonatos, descrita por Vick e Zimmerman (1987), a desidratação do produto de reação de LOX, (9Z,11E,15Z,13S)-13-hidroxiperóxido-9,11,15-ácido octadecatrienoico (13(S)-HPOT), pela ação da enzima AOS constitui um passo chave da via do octadecanoide, pois os 13 HPOT são metabolizados a precursores dos jasmonatos ao invés de serem metabolizados por outras enzimas da via das lipoxigenases. Desde então, pesquisas têm mostrado que a enzima AOS tem importante função de controlar a dinâmica da defesa contra ferimento em plantas (Laudert e Weiler 1998).

Visando identificar uma AOS induzida em folhas de plantas de maracujá em resposta a tratamento com MJ, experimentos de “western blot” foram conduzidos utilizando inicialmente anticorpos policlonais produzidos contra a AOS de tomate que reagiram cruzadamente com uma proteína de ~50 kDa em folhas de plantas tratadas com MJ (Fig. 4). Proteínas AOS purificadas de plantas dicotiledôneas, e ainda AOS produzidas por sistemas de recombinação, são descritas por possuírem pesos moleculares similares ao da proteína imunoreativa induzida em folhas de maracujá. Por exemplo: a AOS de sementes de linho (*Linum usitatissimum*) com ~55 kDa (Song e Brash, 1991); AOS de partículas de borracha em guaiule (*Parthenium argentatum*) com peso de 53 kDa (Pan *et al.*, 1995); duas isoformas encontradas em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) uma denominada LeAOS2 com 55 kDa (Howe *et al.*, 2000), e outra denominada LeAOS3, produzida nas raízes, com 56 kDa (Itoh *et al.*, 2002); AOS de folhas de *Arabidopsis thaliana* com peso de 54 kDa (Laudert e Weiler, 1998); e ainda duas isoformas de AOS de soja, ambas com 55,1 kDa (Kongrit *et al.*, 2007). Em outras plantas, como a batata

são encontradas AOS com peso molecular maiores, que variam entre 56 kDa (StAOS3), 57 kDa (StAOS2), e 60 kDa (StAOS1) (Stumpe *et al.*, 2006). O peso molecular da proteína imunoreativa em maracujá também é comparável ao de proteínas AOS descritas em plantas monocotiledôneas, das quais pode-se citar: a AOS de sementes de milho (*Zea mays*) com 53 kDa (Utisunomiya *et al.*, 2000), uma AOS de arroz (*Oryza sativa*) denominada OsAOS2, com peso molecular de 52 kDa (Agrawal *et al.*, 2002a), e duas isoformas encontradas em cevada (*Hordeum vulgare*), com pesos aproximados de 53 kDa (HvAOS1 e HvAOS2).

Além da banda majoritária de 50 kDa, pode ser observada uma banda protéica com peso molecular maior que também reage cruzadamente como o soro imune (Fig. 5). Essa marcação pode ser explicada pela presença, em outras proteínas, de epítomos imunogênicos comuns aos encontrados na proteína de 50 kDa; ou mesmo uma isoforma de AOS com modificações pós-traducionais que ainda sim reagem com os anticorpos. Uma terceira explicação para esse fato seria a interação da AOS com proteínas desconhecidas. Uma reação cruzada semelhante foi verificada por Howe *et al.* (2002), ao utilizar o mesmo anticorpo utilizado nesse trabalho em experimentos de imunodeteção em plantas de tomate. O grupo detectou uma segunda banda protéica imunoreativa com um peso molecular maior, que foi analisado como uma possível forma não processada da proteína.

As AOS são conhecidas por ser uma classe de proteínas da família de citocromos P450 que são especializadas no rearranjo de hidroperóxidos de ácido graxo (Song e Brash, 1991; Howe *et al.*, 2002). Dessa forma, ensaios espectrofotométricos foram conduzidos com o objetivo de averiguar a indução de proteínas capazes de metabolizar 13-hidroperóxidos em plantas de maracujá após tratamento com MJ. A análise dos resultados demonstrou um aumento significativo da velocidade da metabolização de 13-hidroperóxidos, monitorada a 234 nm, na presença de extrato bruto de plantas tratadas com MJ (Fig. 5), quando comparado ao metabolismo desse substrato na presença de extrato bruto foliar de plantas não tratadas. Esse aumento reforçou a idéia da indução de uma suposta AOS, metabolizadora de 13-hidroperóxidos (também chamada de 13-AOS), em plantas de maracujá como resposta de defesa à exposição a vapores de MJ. A indução da atividade de AOS em plantas, em resposta a herbivoria e tratamento com MJ, vem

sendo descrita na literatura. Laudert e Weiler (1998), por exemplo, demonstraram a indução transitória de AOS em folhas de *A. thaliana* em resposta a tratamento com vários eliciadores de plantas, incluindo o MJ e ABA (ácido abscísico).

Curiosamente, o extrato bruto de folhas de plantas de maracujá não tratadas mantém uma atividade basal metabolizando os 13-hidroperóxidos utilizados nos experimentos (Fig. 4 – linha tracejada/pontilhada). Além de sua função no mecanismo de defesa de plantas, as AOSs também tem sido estudadas quanto ao seu papel no desenvolvimento normal de plantas. Maucher *et al.* (2000) demonstraram a síntese de duas isoformas de AOS durante o desenvolvimento de sementes de cevada com importante atividade na regulação dos níveis de AJ, em células parenquimáticas em torno dos feixes vasculares. Esse acúmulo constitutivo também ocorre em plantas de linho, nas quais níveis basais de AOS foram detectados em todos os órgãos vegetativos, com exceção das sementes, onde a síntese é mais intensa (Harms *et al.*, 1998). Sabe-se que o acúmulo de AJ também está relacionado a vários processos relacionados ao desenvolvimento de várias espécies de plantas (Creelman *et al.*, 1992; Creelman e Mullet, 1995; Wasternak e Parthier, 1997), com isso uma atividade basal constitutiva de AOS, não detectável em nossos experimentos de “western blot”, poderia ser requerida para a formação de níveis basais de AJ nas plantas de maracujá.

Uma outra explicação para esse evento seria a presença de outras enzimas em folhas de plantas de maracujá, como a HPL e DES envolvidas no metabolismo de 13- hidroperóxidos. Essa idéia é corroborada por dados anteriores descritos por Howe *et al.* (2000), que demonstraram o acúmulo de transcritos de HPL em folhas e flores supostamente envolvidos na síntese de aldeídos voláteis com função na produção do aroma floral.

5.2. CLONAGEM E ANÁLISE DO cDNA DA AOS DE FOLHAS DE MARACUJA

As enzimas AOSs são consideradas muito importantes em plantas, visto que seu produto 12, 13-EOT, é um intermediário na biossíntese de AJ, que por sua vez

funciona como um hormônio vegetal envolvido em vários processos fisiológicos das plantas, incluindo o desenvolvimento e as respostas contra estresses. Dessa forma, a AOS possui um papel essencial, tanto na biossíntese de AJ, quanto na resposta de defesa de plantas dependente de AJ (Howe e Schilmiller, 2002; Devoto e Turner, 2003; Kongrit *et al.*, 2007). Recentemente, mais de 20 AOSs tem sido clonadas de várias plantas (Howe e Schilmiller, 2002 ; Agrawal *et al.*, 2004) e a análise dessas proteínas demonstram que as AOS em plantas apresentam significativas divergências de espécie para espécie, no entanto alguns domínios são altamente conservados em todas as espécies (Schuler e Reichhart, 2003; Chehab *et al.*, 2007). Até o momento, pouco se sabe sobre a atividade de AOS em plantas de maracujá envolvidas no mecanismo de defesa dessas plantas. Dessa forma, nesse trabalho, a seqüências de cDNA de plantas foram utilizadas como modelo para o desenho de iniciadores degenerados que foram utilizados para a amplificação de um fragmento do cDNA de AOS de folhas de maracujá, após tratamento com MJ por 12 h. Inicialmente, por RT-PCR, um fragmento de 950 pb foi amplificado e a análise da seqüência de aminoácidos deduzidos mostra alta homologia com AOS de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, tais como: AOS1 de batata e a AOS tabaco, AOS2 de tomate, AOS de laranja, AOS de *Arabidopsis* e AOS2 de arroz. A homologia da AOS de maracujá com as AOS de outras plantas corrobora a presença de um gene de AOS em plantas de maracujá. Estratégias parecidas foram utilizadas por: Sivasankar *et al.* (2000), que obtiveram um clone parcial de 950 pb do cDNA de uma AOS de tomate (LeAOS-2), a partir das seqüências de AOS encontradas em gaiule e sementes de linho; e Agrawal *et al* (2002a) que obtiveram um clone parcial de AOS de arroz (*Oryza sativa*) com a utilização de iniciadores degenerados baseados em seqüências conservadas de AOS de cevada e utilizando como molde RNA total de plantas de arroz tratadas com metil jasmonato por 24 h.

Apesar de preliminares, esses dados serviram como ponto de partida para a obtenção do cDNA total da AOS de maracujá. A análise da seqüência do fragmento de 950 pb possibilitou o desenho de iniciadores específicos para a amplificação da regiões 5' e 3' do cDNA (Fig. 8). Esses iniciadores, utilizados em reações distintas (juntamente com o oligo dT), permitiram a amplificação e clonagem de 2 fragmentos correspondentes a região 3' do cDNA de maracujá, incluindo a região

não traduzida da seqüência (Fig. 10 e 11); enquanto que a região 5', incluindo a seqüência não traduzida anterior a ORF do cDNA de AOS foi obtida pela técnica de RACE 5' (Fig. 12).

A sobreposição dos 3 fragmentos obtidos por RT-PCR e RACE 5' permitiram a obtenção da seqüência completa do cDNA da AOS de maracujá. A seqüência total obtida demonstra uma ORF de 1.512 pb, que codifica uma proteína de 504 aminoácidos, com peso molecular estimado de 56 kDa. Esse peso molecular estimado corrobora as análises bioquímicas por "western blot" mostradas anteriormente (Fig. 5). Em várias seqüências de cDNA clonados em plantas, observa-se um códon de parada de tradução na região 5' não codante, anterior ao códon de início da tradução da proteína, como é o caso da AOS de linho (Song *et al.*, 1993) e AOSs1 e 2 de tomate (Sivasankar *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2000). Esse códon de parada também está presente na *PfAOS* reforçando a similaridade entre essas seqüências. A seqüência deduzida de aminoácidos, mostrada na figura 14, em comparação com AOS de outras plantas mono e dicotiledôneas, revelaram que a há uma homologia maior entre a AOS de maracujá e proteínas AOS de plantas dicotiledôneas (65 a 68%) quando comparada a homologia com as AOSs de monocotiledôneas (55 a 56%), demonstrando a similaridade entre as AOSs em plantas dicotiledôneas.

O domínio mais diagnóstico da família de citocromos P450 é um motivo próximo da região C-terminal que circunda o sítio de ligação a grupamentos Heme (FxxGxxxCxG)(Brash e Song, 1995). Em enzimas AOS, uma característica comum é a substituição do resíduo inicial fenilalanina (F), por uma prolina (P) como o primeiro resíduo conservado do domínio de ligação a grupamentos Heme (Maucher *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2002). Além disso, esse domínio é encontrado com algumas variações formando a região, P-V-NKQCAG, sendo altamente conservada nos membros da subfamília CYP74A de citocromo P450 (Schuler e Reichhart, 2003; Maucher *et al.*, 2000). A seqüência de aminoácidos deduzida da AOS de maracujá, apresenta todos os resíduos conservados, com exceção de uma transição (G⁴⁵¹ → S) em comparação com a seqüência de aminoácidos de AOSs de *Arabidopsis*, laranja e tomate (LeAOS2) (Howe *et al.*, 2000; Laudert *et al.*, 1996). A alteração desse resíduo também é observada em AOSs de guaiule e linho, nas quais o

resíduo glicina (G) é substituído por uma glutamina (E) e alanina (A), respectivamente (Pan *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1993). Devido a essas variações, esse sítio constitui um alvo de experimentos envolvendo mutações que permitam identificar o papel da estrutura na função de ligação a grupamentos heme nas AOSs.

Um outro domínio conservado entre os citocromos P450 é a estrutura dentro da I - Hélice (**GxxxT**), na qual os resíduos G e T estabelecem contato próximo com o oxigênio (Porter e Coon, 1991). Embora o resíduo G esteja presente, o outro resíduo T é substituído em todas as AOSs conhecidas (Song *et al.*, 1993). A substituição do resíduo de treonina nas seqüências de AOS, classificadas na subfamília CYP74A, é responsável pela perda da atividade de oxigenase, uma vez que o resíduo está envolvido no processo de ativação pelo O₂. (Porter e Coon, 1991; Brash e Song, 1995); Na seqüência de PfAOS o resíduo de treonina (T³¹⁴) é substituído por um resíduo de Isoleucina (I) reforçando a idéia de que o cDNA clonado é responsável pela codificação de uma AOS. No entanto, essa alteração também é verificada em tomate, tabaco e batata que apresentam um resíduo de fenilalanina (F) na mesma posição (Howe *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2001; Stumpe *et al.*, 2006). Uma outra alteração é encontrada em Arabidopsis (Laudert *et al.*, 1996), laranja (Wu e Burns, não publicado), linho (Song e Brash, 1993) e guaiule (Pan *et al.*, 1995) que mantém um resíduo de lisina (L) em substituição ao resíduo de treonina, assim como ocorre em plantas de arroz (Agrawal *et al.*, 2002a). Variações nesse domínio têm sido largamente descritas nas seqüências primárias de enzimas AOS de plantas (Laudert *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2002) que mantém um domínio conservado **-G-KILF** distinto em relação ao mesmo domínio **-G-SIFL** na subfamília CYP74B.

Um terceiro domínio conservado na família dos citocromos P450, encontrado a aproximadamente 50 aminoácidos após o sítio I-Helix, é denominado “K- Helix” (**KSVVYETLR**), do qual, os resíduos glutamato (E) e arginina (R), juntamente com a cisteína (C) encontrada no sítio de ligação a Heme, compreendem resíduos que são universalmente conservados nos citocromos P450, enquanto que o resíduo de serina (S) se mantém comum em todas as AOS (Pan *et al.*, 1998). A PfAOS apresenta um motivo KSVVYEVLRL, e desta forma mantém os resíduos conservados

E e R em sua seqüência, sem substituições. A modificação do resíduo de treonina (T³⁷⁶) por uma valina (V), também é observado em plantas de laranja (Wu e Burns, não publicado). Outras alterações são descritas em AOS de arroz (Agrawal *et al.*, 2002) e tomate (Howe *et al.*, 2000) que contém resíduos alanina (A), em substituição ao resíduo de treonina. A análise do sítio conservado K-helix, nos permite verificar uma possível divergência entre as AOS de dicotiledôneas e monocotiledôneas uma vez que todas as AOS de dicotiledôneas analisadas mantêm os resíduos conservados KSVVY, quando comparados as AOS de monocotiledôneas, arroz e cevada, onde ocorre, em ambas, a substituição do primeiro resíduo de valina (V) por uma alanina (A). Como já mencionado nessa seção, os citocromos P450 são geralmente classificados a partir de domínios altamente conservados na estrutura secundária e terciária, mas com variações na seqüências primárias entre os membros de família de proteínas (Schuler e Reichhart, 2003). Dados da literatura vêm demonstrando que as AOS são separadas em dois grupos, as monocotiledôneas e as de dicotiledôneas (Agrawal *et al.*, 2002). Esta separação é reforçada pela análise filogenética mostrada na figura 15. A PfAOS parece compartilhar a mesma origem evolutiva das AOSs de dicotiledôneas, sendo agrupada juntamente com estas enzimas, principalmente com a AOS produzida em melão (Tijet *et al.*, não publicado). O agrupamento das AOS produzidas em monocotiledôneas também é claramente reconhecido na análise. Essa separação poderia então ser explicada pelas pequenas diferenças na estrutura primária entre as AOS de mono e dicotiledôneas. Conseqüentemente, análises detalhadas das diferenças entre as estruturas primárias das AOS produzidas em plantas poderia ampliar as informações sobre os papéis dessa enzima no desenvolvimento das plantas. É interessante observar ainda que a AOS de maracujá foi agrupada juntamente com AOSs que são descritas por estarem associadas ao mecanismo de defesa de plantas contra o ataque de insetos e patógenos, estando envolvidas na biossíntese de AJ, como é o caso das AOS de linho, tomate (AOS1 e 2), tabaco e *Arabidopsis*, (Harms *et al.*, 1995; Sivasankar *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2001; Kubigsteltig *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002). Esse agrupamento reforça a idéia de que a PfAOS esteja envolvida no mecanismo de defesa de plantas de maracujá.

Baseado nos critérios descritos por Emanuelsson *et al.* (2000), foi identificado um peptídeo sinal de direcionamento a cloroplasto na região N-terminal da proteína deduzida da PfAOS, através da análise da sequência feita no programa ChloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/) indicando que a AOS produzida em plantas de maracujá tem sua localização no interior dos cloroplastos. A análise demonstra a presença de um peptídeo sinal de 43 aminoácidos com um enriquecimento de aminoácidos hidroxilados serina e treonina (25% de resíduos de serina (Ser - 3, 7, 12, 14, 21, 23, 36, 38) e treonina (Thr - 9, 10, 27)). AOS encontradas em plantas, tais como: linho (Song *et al.*, 1993; Brash e Song, 1995), *Arabidopsis* (Laudert *et al.*, 1996) e tomate (Howe *et al.*, 2000; Sivasankar *et al.*, 2000) foram previamente descritas por possuírem seqüências de direcionamento para o cloroplasto, estando envolvidas na resposta de defesa de plantas contra estresses bióticos. Em tomate, esse evento foi confirmado previamente por Froehlich *et al.*, (2001), que demonstrou o direcionamento de AOS para a membrana interna dos cloroplastos voltada para a região do estroma das organelas. Entretanto, seqüências similares não são encontradas em AOS de duas isoformas de cevada (Maucher *et al.*, 2000), apesar de em seus experimentos o autor demonstrar o direcionamento das isoformas para os plastídeos. Esse peptídeo sinal também não é encontrado em plantas de guaiule (Pan *et al.*, 1995), sendo este o único exemplo de AOS não direcionada para o cloroplasto. De uma maneira geral, a maioria das AOS isoladas ou clonadas de plantas monocotiledôneas são descritas por não apresentarem seqüência de direcionamento para cloroplastos (Maucher *et al.*, 2000; Haga e Iino, 2004). Contudo, uma AOS de arroz (OsAOS1) apresenta uma seqüência predita de direcionamento para cloroplasto (Haga e Iino, 2004). A presença dessa seqüência reforça a idéia da proximidade entre a AOS1 de arroz e as AOS de dicotiledôneas (Fig. 16).

De acordo com a regra de classificação utilizada, baseada na comparação de seqüências, descrita por Howe e Schillmiller (2002), a enzima AOS, produzida em plantas de maracujá, apresenta vários padrões utilizados para distinguir a família CYP74 de citocromos P450. A família CYP74 é subdividida em quatro subfamílias, de acordo com a atividade enzimática e a especificidade ao substrato. Dessa forma, a análise filogenética feita entre a PfAOS e os outros membros da família CYP74,

levou a uma melhor identificação da subfamília a qual a enzima pertence. (Fig. 17). Como resultado, a PfAOS foi agrupada juntamente com os membros da subfamília CYP74A, que são caracterizados como enzimas AOS com atividade específica sobre 13-hidroperóxidos sendo chamadas de 13-AOS. Esse dado também é corroborado pela presença de uma seqüência de direcionamento a cloroplastos na PfAOS, visto que todas os membros dessa subfamília são descritos por serem direcionados para as membranas internas ou externas de cloroplastos (Howe e Schillmiller 2002). No entanto, análises bioquímicas complementares devem ser feitas para melhorar o entendimento dos papéis dessa enzima na sinalização de defesa em plantas de maracujá. Recentemente, Hughes et al (2006b) propuseram novas regras para a classificação das enzimas da família CYP74, baseando-se na sua atividade bioquímica. Assim, futuras análises da atividade bioquímica da AOS de maracujá será fundamental na classificação dessa enzima dentro das CYP74.

Após o processamento, a proteína ativa predita da seqüência de PfAOS corresponde a 461 aminoácidos, com um peso molecular estimado de ~51 kDa, reforçando os resultados bioquímicos obtidos nesse trabalho, mostrados nas figura 4 e 5, a partir da imunodeteção de uma proteína de peso molecular aproximado com atividade metabolizadora de 13-HPOT em folhas de maracujá tratadas com MJ.

5.3. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA AOS DE MARACUJÁ

Os dados aqui apresentados mostram a imunolocalização de uma proteína homóloga a AOS de tomate em folhas de maracujá. Esses dados demonstram que a suposta AOS de maracujá se acumula nos cloroplastos de células mesofílicas, preferencialmente na região do estroma e, em menor freqüência, nas membranas dos tilacóides (Fig. 18). Em adição, nos experimentos foi verificada uma associação basal de AOS ao citoplasma celular, que poderia representar as proteínas durante o direcionamento definitivo para os cloroplastos. Esse acúmulo aparentemente está associado ao mecanismo de defesa de plantas de maracujá, visto que plantas não tratadas com MJ (controle) não apresentaram nenhuma marcação, quando incubadas com o mesmo soro imune. Sabe-se que as AOS são enzimas responsáveis pela dehidrogenação de 13-hidroperóxidos, produzidos pela ação de

lipoxigenases (Vick e Zimmerman, 1987). Em adição, em plantas de maracujá uma produção majoritária de 13-hidroperóxidos, se deve a atividade de uma lipoxigenase, localizada, majoritariamente, na região do estroma de cloroplastos, induzida em resposta a tratamento com MJ (Rangel *et al.*, 2002). Isso explicaria a localização de AOS em cloroplastos, no maracujá, visto que a enzima LOX prove substratos para a atividade de AOS. Uma variedade de AOS produzidas em plantas são localizadas nos cloroplastos, como as AOS produzidas em espinafre (Vick e Zimmerman, 1987), linho (Harms *et al.*, 1995) e cevada (Maucher *et al.*, 2000). Froehlich *et al.*, (2001) demonstraram, através da técnica de fracionamento, a associação de AOS a membrana interna dos cloroplastos em plantas de tomate. Mais recentemente, Farmaki *et al.* (2007), através de experimentos de imunolocalização e fracionamento de cloroplastos, demonstraram que AOS de batata produzidas constitutivamente em condições normais são localizadas preferencialmente nas membranas do tilacóide. Esses dados indicam que a localização de enzimas AOS em várias espécies de plantas pode variar quanto a sua localização no cloroplasto, como também quanto à natureza da associação na estrutura do cloroplasto.

Dados encontrados na literatura demonstram que algumas características são comuns a proteínas direcionadas a cloroplastos em plantas, dentre essas é mencionada a clivagem de um precursor de AOS durante sua importação para o cloroplasto (Froehlich *et al.*, 2001). Esses dados são consistentes com a presença de um suposto peptídeo de direcionamento a cloroplasto na região N-terminal da sequência predita da PfAOS. Porém, algumas AOS, apesar de se acumularem em cloroplastos, não apresentam nenhuma sequência de direcionamento a cloroplastos como é o caso das AOS de cevada (Maucher *et al.*, 2000), indicando a existência de outros mecanismos de direcionamento de AOS na célula.

Até o momento, pouca informação se tem sobre uma detalhada caracterização bioquímica das AOS de plantas. Hughes *et al.* (2006a) observaram o efeito de micélas de detergentes na atividade catalítica da AOS de *Arabidopsis*, demonstrando um aumento de 48 vezes da atividade da enzima na presença detergente, devido à formação de associações de AOS em micelas. Dados anteriores, similares a esse, indicam que a AOS de linho apresenta o mesmo padrão

de ativação por detergente (Song e Brash, 1991). Em adição, Hughes et al (2006a) sugerem que o sistema de associação em micélios de AOS, ocasionado por detergentes, é similar ao estado de associação da enzima a membranas no cloroplasto (forma microssomal da enzima); enquanto que a ausência dessas micélas representa a forma solúvel (não associadas a membranas) da enzima. Dessa forma, a análise do comportamento das enzimas AOS em relação a sua localização seriam importantes no estudo de sua atividade biológica. De maneira interessante, nossos resultados demonstraram a presença de AOS nos cloroplastos de folhas de maracujá, livres na região do estroma, e em menor quantidade, formas da enzima associadas às membranas do tilacóide, indicando uma atividade *in vivo* de ambos os estados da enzima. Esse padrão de localização subcelular pode estar relacionado à mobilização de formas de PfAOS associadas a membrana para formas solúveis da enzima. Essa idéia é reforçada pelo resultado demonstrado na figura 5, onde uma banda protéica de tamanho superior a 94 kDa foi visualizada nos experimentos de “western blot”, podendo ser o resultado de uma dimerização da proteína de ~50 kDa (conforme discutido anteriormente). Esses dados são fortemente corroborados pelos resultados obtidos por Hughes et al (2006b) que demonstraram, através de análises por gel filtração, a formação de um dímero, com peso molecular de 110 kDa, da AOS de *Arabidopsis* em presença de detergente; enquanto que na ausência do detergente só foram observadas formas monoméricas com o peso molecular de 55 kDa.

Posteriores investigações sobre a atividade biológica *in vivo* da AOS de maracujá, na presença e ausência de detergentes, poderiam nos prover maiores informações sobre o comportamento dessa enzima no mecanismo de defesa de plantas de maracujá, visto que a localização da AOS e outras enzimas da via do octadecanóide, assim como os produtos do metabolismo dessas enzimas são determinantes importantes para o padrão de oxilipinas dessas plantas durante sua resposta de defesa.

5.4. ANÁLISE DO GENE DE AOS E SUA EXPRESSÃO EM RESPOSTA A FERIMENTO E TRATAMENTO COM METIL JASMONATO

Utilizando o fragmento de 950 pb clonado, através de análises por “southern blot”, analisamos a quantidade de cópias do gene PfAOS, no genoma de maracujá. Como resultados foi possível observar que o gene se encontra, aparentemente, em cópia única no genoma (Fig. 20). Esse dado é compatível com a quantidade de genes AOS descritos em outras plantas. Em planta de linho e *Arabidopsis*, apenas uma cópia do gene foi descrita (Song *et al.*, 1993; Laudert *et al.*, 1996). Já em plantas de tabaco foram descritas 2 cópias (Ziegler *et al.*, 2001). Em tomate, foram descritas 3 cópias (Howe *et al.*, 2000; Sivasankar *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2002). Esse mesmo número é encontrado em cevada (Maucher *et al.*, 2000; 2004). Em plantas de arroz são descritas cerca de 2 a 5 cópias do gene (Agrawal *et al.*, 2004; Haga e lino, 2004; Chehab *et al.*, 2007).

A detecção de transcritos de AOS em folhas de plantas em resposta a ferimento e tratamento com MJ tem sido largamente descrita na literatura. Sivasankar *et al.* (2000) demonstraram a indução da expressão de AOS em folhas de tomate em resposta a ferimento e tratamento com eliciadores envolvidos na sinalização da resposta de defesa de plantas. Em *Arabidopsis*, foi demonstrado o acúmulo sistêmico e transitório de transcritos de AOS em resposta a ferimento mecânico (Laudert e Weiler, 1998). Em nosso trabalho, foi demonstrado que folhas de plantas de maracujá obedecem a um complexo controle local e sistêmico de resposta a ferimento. Folhas feridas apresentaram um aumento transitório da expressão de AOS, tanto nas folhas injuriadas quanto sistemicamente em folhas adjacentes não feridas (Fig. 19). Um acúmulo de AOS similar aos obtidos em plantas de maracujá, também foi descrito em plantas de tomate por Howe *et al.* (2000), que demonstraram a expressão induzida de AOS em resposta a herbivoria com uma cinética comparável a demonstrada em nosso trabalho. Além disso, Ziegler *et al.* (2001), observaram que plantas de tabaco submetidas herbivoria, por larvas de *Manduca sexta*, apresentavam a indução sistêmica de transcritos de AOS após 1 h decorrido o tratamento. Essa indução é reforçada quando as plantas são tratadas com MJ.

Em plantas de maracujá, a expressão de AOS, também foi demonstrada por ser induzida fortemente por tratamento com MJ, evidenciado um possível controle por feedback positivo, uma vez que a AOS é considerada a enzima chave na rota de

biossíntese do ácido jasmônico e seus derivados. A indução de transcrição de AOS por tratamento com MJ também é descrito em linho (Harms *et al.*, 1998), *Arabidopsis* (Laudert e Weiler, 1998), cevada (Maucher *et al.*, 2000) e tomate (Sivasanker *et al.*, 2000).

Apesar de várias plantas apresentarem um padrão de intensificação da via do octadecanóide pela adição de MJ (Laudert e Weiler, 1998), pesquisas têm demonstrado que a aplicação de MJ não leva a biosíntese *de novo* de AJ (Kramell *et al.*, 2000), apesar de provocar um aumento na transcrição de AOS, conforme observado em nossos resultados e como descrito por outros autores (Maucher *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2001). Logo, a significância biológica da indução da transcrição do gene de AOS em plantas, pela aplicação exógena de MJ ainda permanece por ser desvendada.

5.5. INDUÇÃO DE PROTEÍNAS DEFENSIVAS EM TECIDO FOLIAR DE PLANTAS DE MARACUJÁ

Os inibidores de proteinase são bem descritos na literatura por serem uma classe de inibidores reversíveis de enzimas como tripsina, quimiotripsina, papaína, catepsina, dentre outras. Esses inibidores são conhecidos por serem induzidos tardiamente, em resposta a ferimento e tratamento com MJ, sendo o produto final da via do octadecanóide (Bolter 1993; Siqueira_Junior *et al.*, 2002). Em plantas de maracujá a indução de inibidores de proteinase cisteínicas em folhas feridas e tratadas com MJ, foi analisada, levando a observação e que esse inibidor é induzido em ambas as condições de estresse. Uma vez que a AOS é responsável pelo acúmulo de ácido jasmônico em plantas, é razoável presumir que a indução da expressão de cistatina pode ser atribuída a atividade induzida de AOS em folhas de maracujá. Em tomate, também foi descrita a indução da expressão do gene AOS em paralelo com a expressão de genes que codificam inibidores de proteinase (Sivasankar *et al.*, 2000). Juntos, esses dados reafirmam o papel da enzima AOS no mecanismo de resposta de defesa de plantas contra o ataque de insetos mastigadores (herbívoros).

6. CONCLUSÕES

1. Em plantas de maracujá, a exposição de folhas a vapores de metil jasmonato durante 24h induz um aumento da velocidade de metabolização de hidroperóxidos comparado a plantas não tratadas. Esse aumento do metabolismo de hidroperóxidos pode estar associado a uma proteína de aproximadamente 50 kDa com suposta atividade de AOS, sintetizada em folhas de maracujá nas mesmas condições de estresse;
2. Com a utilização das técnicas de RT-PCR e RACE 5' preparadas com RNA total de folhas de maracujá expostas a vapores de Metil jasmonato, por 12 h, foi obtido um cDNA que codifica um polipeptídeo com alta similaridade a seqüência de AOS de plantas dicotiledôneas e com menor similaridade a monocotiledôneas;
3. A análise da seqüência de aminoácidos do cDNA da AOS demonstrou a codificação de uma proteína de 504 aminoácidos contendo uma seqüência de sinalização para cloroplastos, que apresenta regiões conservadas comuns em todas as proteínas da subfamília de citocromos P450. Análises filogenéticas dos membros da subfamília CYP74 de citocromos P450 resultou no agrupamento da AOS de maracujá no ramo da subfamília CYP74A;
4. Análises demonstram a presença de uma única cópia do gene de AOS no genoma de maracujá que é ativado sistemicamente em resposta a ferimento e tratamento com metil jasmonato;
5. Análise de microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a enzima AOS se acumula nos cloroplastos, na região do estroma e nas membranas dos tilacóides, em folhas de maracujá em resposta ao tratamento com metil jasmonato;
6. A indução sistêmica de inibidores de proteinase cisteínica em resposta a ferimento e tratamento com metil jasmonato foi demonstrada através de ensaios enzimáticos e imuno detecção.

REFERÊNCIAS

- ABE, M., ABE, K., IWABUCHI, K., DOMOTO, C., ARAI, S. (1994) Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *J Biochem.* 116, 488-492.
- AGRAWAL, G. K., RAKWAL, R., JWA, N., HAN, K., AGRAWAL, V. P. (2002a) Molecular cloning and mRNA expression analysis of the first rice jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase. *Plant Physiol Biochem*, 40, 771-782.
- AGRAWAL, G. K., RAKWAL, R., TAMOGAMI, S., YONEKURA, M., KUBO, A., SAJI, H. (2002b) Chitosan activates defense/stress reponse(s) in the leaves of *Oriza sativa* seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 40, 1061-1069.
- AGRAWAL, G. K., TAMOGAMI, S., OKSOO, H., IWAHASHI, H., RAKWAL, R. (2004) Rice octadecanoid pathway. *Biochem Biophys Res commun*, 317, 1-15.
- AGRIOS, G. N. (1997) How plants defend themselves against pathogens. In: *Plant Pathology*. 3ª edição. Academic Press, Inc., London, 97-115.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-410.
- ARIMURA, G., KOST, C., BOLANDT, W. (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim et Biophys Acta*, 1734, 91-111.
- ATKINSON, D., McKINLAY, R.G. (1995) Crop protection in sustainable farming systems. In: McKINLAY, R.G.; ATKINSON, D. Integrated crop protection: towards sustainability. Farnham: British Crop Protection Council, 483-488 (BCPC Symposium Proceedings, 63).
- AVDIUSHKO, S., CROFT, K. P. C., BROWN, G. C., JACKSON, D. M., HAMILTON-KEMP, T. R., HILDEBRAND, D. (1995) Effect of volatile methyl jasmonate on



- the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 109, 1227-1230.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B., DINESH-KUMAR, S. P. (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276, 726-733.
- BALDWIN, I. T. (1998) Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 8113-8118.
- BALDWIN, I. T., PRESTON, C. A (1999) The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Plant*, 208, 137-145.
- BELL, E., CREELMAN, R. A., MULLET, J. E. (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8675-8679.
- BELL, E., CREELMAN, R. A., MULLET, J. E. (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8675-8679.
- BENHAMOU, N. (1996) Elicitor-induced plant defence pathway. *Trends Plant Sci.* 1: 233-240.
- BENNETT, R. N., WALLSGROVE, R. M. (1994) Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. *New Phytol*, 127, 617-633.
- BLÉE, E. (1998) Phytooxilipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res*, 37: 33-72.
- BOLTER, C. J. (1993) Methyl jasmonate induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. *Plant Physiol*, 103, 1347-1353.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-1976.

- BRAIOT, E., VIANELLO, A., PETRUSSA, E., MACRI, F. (1993) Dissipation of the eletrochemical proton gradient in phospholipase- induced degradation of plant mitochondria and microsomes. *Plant Sci*, 90, 31-39.
- BRASH. A. R., SONG, W. C. (1995) Structure and function feautres of flaxseed allene oxide synthase. *J Lipid Mediator signalling*, 12, 275-282
- CAMERA, S. L., GOUZERH, G., DHONDT, S., HOFFMANN, L., FRITIG, B., LEGRAND, M., HEITZ, T. (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immun Rev*, 198, 267-284.
- CHEHAB, E. W., PEREA, J. V., GOPALAN, B., THEG, S., DEHESH, K.M. (2007) Oxylipin pathway in Rice and *Arabidopsis*. *J integrat Plant Biol*, 49, 43-51.
- CONCONI, A., MIQUEL, M., BROWSE, J. A., RYAN, C.A. (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol*, 111, 797-803.
- CONSTABEL, C. P., BERGEY, D., RYAN, C. A. (1995) Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol-oxidase via the octanoid defense signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 407-411.
- CREELMAN, R. A. MULLER, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 355-381.
- CUNHA, M. A. P., BARBOSA, L. V., FARIA, G. A. (2004) Botânica. In: Lima, A. A., Cunha, M. A., Maracujá: produção e qualidade de passicultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA 325-343
- DEVOTO, A., TURNER, J. G. (2005) Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network *Physiol Plant*, 123, 161-172.
- DEVOTO, A., TURNER, J. G. (2003) Regulation of jasmonated-mediated palnt responses in Arabidopsis. *Ann Bot*, 92, 329-337.



- DICKE, M., VAN LOON, J. J. A., JONG, P. W. (2004) Ecogenomics benefits community ecology. *Science*, 305, 618-619.
- DIXON, R. A., HARRISON, M. J., LAMB, C. J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol*, 32, 479-501.
- DOARES, S. H., SYROVETS, T., WEILER, E.W., RYAN, C. A. (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 4095-4098.
- EMANUELSSON, O., NIELSEN, H., BRUNAK, S., HEIJNE, G., v. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 300, 1005 -1016.
- FARMER, E. E., and RYAN, C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonate acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4, 129-134.
- FARMAKI, A., SANMARTÍN, M., JIMÉNEZ, P., PANEQUE, M., SANZ, C., VANCANNEYT, G., LEÓN, J., SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. (2007) Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *J Exp Bot*, 58, 555-568.
- FERNANDES, G. W. (1998) Hypersensitivity as a phenotypic basis of plant induced resistance against a galling insect (Diptera: Cecidomyiidae). *Environ Entomol*, 27, 260-267.
- FEUSSNER, I., KINDL, H. (1994) Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes. *Planta*, 194, 22-28.
- FROELICH, J. E., ITOH, A., HOWE, G. A. (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol*, 125, 306-317.



- GATEHOUSE, J. A. (2002) Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol*, 156, 145-169.
- GHINI, R., BETTIOL, W. (2000) Proteção de plantas na agricultura sustentável. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, 17, 61-70.
- GOZZO, F. (2003) Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J Agric Food Chem*, 51, 4487-4503.
- HAGA, K., LINO, M. (2004) Phytochrome-mediated transcriptional Up-regulation of allene oxide synthase in rice seedlings. *Plant mol biol*, 45, 119 – 128.
- HAMBERG, M. (1988) Biosynthesis of 12-oxo-10, 15(Z)-phytodienoic acid: identification of allene oxide cyclase. *Biochem Biophys Res commun*. 156, 543-550.
- HAMBERG, M., FAHLSTADIUS, P. (1990) Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 276, 518-526.
- HAMBERG, M., GARDNER, H.W. (1992). Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156, 1–18.
- HAMBERG, M., (2000) New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. *Lipids*, 35, 353-363.
- HARBORNE, J. B. (1988) Introduction to ecological biochemistry. London, UK: Academic Press
- HARMS, K., ATZORN, R., BRASH, A., KUHN, H., WASTERACK, C., WILLMITZER, L., PEÑA-CORTÉS, H. (1995) Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increase endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant Cell*, 7, 1645-1654.



- HARMS, K., RAMIREZ, I., PEÑA-CORTÉS, H. (1998) Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiol*, 118, 1057-1065.
- HAY, M. E. (1986) Associational plant defenses and the maintenance of species diversity: turning competitors into accomplices. *Am Nat*, 128, 617-641.
- HEIL, M., BALDWIN, I. T. (2002) Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Sci*, 7, 61-67.
- HEITZ, T., BERGEY, D. R. RYAN, C. A. (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 114, 1085-1093.
- HOWE, G. A., SCHILMILLER, A. L. (2002) Oxylipins metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol*, 5, 230-236.
- HOWE, G.A., LEE, G.I., ITOH, A. LI, L., DEROCHER, A.E. (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol*, 123, 711-724.
- HOWE, G. A. (2004) Jasmonate as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul*, 23, 223-237.
- HILL, D. S., WALLER, J. M. (1994) Passion fruit, In: Hill, D. S., Waller, J. M. Pests and diseases of tropical crops vol 2: handbook of pests and diseases. Longman Scientific & Technical, New York, 243-245.
- HUGHES, R. K., BELFIELD, E. J., ASHTON, R., FAIRHURST, S. A., GOBEL, C., FEUSSNER, I., CASEY, R. (2006a) Allene oxide synthase from *Arabidopsis thaliana* (CYP74A1) exhibits dual specificity that is regulated by monomer-micelle association. *FEBS Lett*, 580, 4188-4194.



- HUGHES, R. K., BELFIELD, E.J., CASEY, R. (2006b) CYP74C3 and CYP74A1, plant cytochrome P450 enzymes whose activity is regulated by detergent micelle association, and proposed new rules for the classification of CYP74 enzymes. *Biochem Soc Trans*, 34, 1223-1227.
- LIMA, A. A., CUNHA, M. A., Maracujá: produção e qualidade de passicultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA 325-343
- [Http://www.maracuja.com.br/body_cultivo.htm](http://www.maracuja.com.br/body_cultivo.htm) . Site especializado em Maracujá.
- ITOH, A., HOWE, G. A. (2001) Molecular cloning of a divinyl ester synthase: identification as a CYP74 cytochrome P450. *J. Biol. Chem*, 276, 3620-3627.
- ITOH, A., SCHILMILLER, A. L., MCCAIG, B. C., HOWE, G. A. (2002) Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *J Biol Chem*, 277, 46051-46058
- JACINTO, T., FERNANDES, K. V. S., MACHADO, O. L. T., SIQUEIRA-JÚNIOR, C. L. (1998) Leaves of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin accumulate high levels of cystatin. *Plant Sci*, 138, 35-42.
- KAHN, D.M., CORNELL, H. V. (1983) Early leaf abscission and folivores: comments and considerations. *Am Nat*, 122, 428-432.
- KLOEK, A. P., ERBSKYML, V., SHARMA, S. B., HOELZ, J. E., VOGEL J, KLESSIGDF, KUNKEL, B. N. (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J*, 26: 509–522.
- KOHLMANN, M. (1999) Formation of lipooxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. *Eur J Biochem*. 260, 885–895.
- KONGRIT, D., JISAKA, M., IWANAGA, C., YOKOMICHI, H., KATSUBE, T., NISHIMURA, K., NAGAYA, T., YOKOTA, K. (2007) Molecular cloning and functional expression of soybean allene oxide synthases. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 491-498.



- KRAMELL, R., MIERSH, O., ATZORN, R., PARTHIER, B., WASTERACK, C. (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the “oxylipin signature” in stressed barley leaves. Implication for different signaling pathways. *Plant Physiol*, 123, 177-187.
- KUBIGSTELTIG, I., LAUDERT, D., WEILER, E. W. (1999) Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta*, 208, 463-471
- KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 5, 150-163.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LAUDERT, D., PFANNSCHMIDT, U., LOTTSPEICH, F., HOLLÄNDER-CZYTOKO, H., WEILER, E. W. (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol*, 31, 323-335.
- LAUDERT, D., WEILER, E. W., (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J*, 15, 675-684.
- LEON, J. ROJO, E. SANCHEZ-SERRANO, J. J. (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot*, 52, 1-9.
- MADUREIRA, H. C., DA CUNHA, M., JACINTO, T. (2006) Immunolocalization of a defense-related 87 kDa cystatin in leaf blade of tomato plants. *Environ Exp Bot*, 55, 201-208.
- MAUCHER, H., HAUSE, B., FEUSSNER, I., ZIEGLER, J., WASTERACK, C. (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J*, 21: 199–213.



- MAUCHER, H., STENZEL, I., MIERSCH, O., STEIN, N., PRASAD, M., ZIEROLD, U., SCHWEIZER, P., DORER, C., HAUSE, B., WASTERACK, C. (2004) The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)-cloning and organ specific expression. *Phytochemistry*, 65, 801-811.
- MCCONN, M., CREELMAN, R. A., BELL, E., MULLET, J.E., BROWSE, J. (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 5473-5477.
- MCGURL, B., OROZCO-CARDENAS, M., PEARCE, G. & RYAN, C. A. (1994) Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generate a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc Natl Acad Sci 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.
- OROZCO-CARDENAS, M., RYAN, C. A. (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 6553-6557.
- PAN, Z., DURST, F., WERCK-REICHART, D., GARDNER, H. W., CAMARA, B., CORNISH, K., BACKHAUS, R. A. (1995) The major protein of guaiúle rubber particles is a cytochrome P450. *J Biol Chem*, 270, 8487-8494.
- PAN, Z., CAMARA, B., GARDNER, H. W., BACKHAUS, R. A. (1998) Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide synthase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase. *J Biol Chem*, 273, 18139-18145.
- PARK, J. H., HALITSCHKE, R., KIM, H. B., BALDWIN, I. T., FELDMANN, K. A., FEYEREISEN, R. (2002) A knockout mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonate acid biosynthesis. *Plant J*, 31, 1-12.



- PEARCE, G., RYAN, C. A. (2003) Sistemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. *J Bio Chem*, 278, 30044-30055.
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S., RYAN, C. A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 253, 895-898.
- PEÑA-CORTÉS, H., ALBRECHT, T., PRAT, S., WEILER, E. W., WILLMITZER, L. (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, 191, 123-128.
- PEÑA-CORTÉS, H., FISAHN, J., WILLMITZER, L. (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 4106 – 4113.
- PIRES, M. M., MATA, H. T. C. (2004) Uma abordagem econômica e mercadológica para a cultura do maracujá no Brasil. In: Lima, A. A., Cunha, M. A., Maracujá: produção e qualidade de passicultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA 325-343
- PORTA, H., ROCHA-SOSA, M. (2002) Plant Lipxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiol*, 130, 15-21.
- RANCE, I., FOURNIER, J., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasidica* var. *nicotianae* race o and tobacco is supressed in transgenic plants expressing antisense lipxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 6554-6559.
- RANGEL, M., MACHADO, O. L. T., DA CUNHA, M., JACINTO, T. (2002) Accumulation of chloroplast-targeted lipxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. *Phytochemistry*, 60, 619-625.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. (2001) A perspectiva humana. In: *Biologia Vegetal*. 6ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 788-811.



- ROYO, J., LEÓN, J., VANCANNEYT, G., ALBAR, J. P., ROSAHL, S., ORTEGO, F., CASTANERA, P., SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96,1146-1151.
- RYAN, C. A. (1990) Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and phatogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 425-449.
- RYAN, C.A. (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477: 112-121.
- SAMBROOK, J., RUSSE, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 9.46
- SCHALLER, A., RYAN, C. A. (1996) Systemin: a polypeptide defense signal in plants. *Bioessay* 18: 27-33.
- SCHALLER, F. (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J Exp Bot*, 52: 11-23.
- SCHALLER, F., SCHALLER, A., STINTZI, A. (2005) Biosynthesis and Metabolism of Jasmonates. *J Plant Growth Regul*, 23, 179-199.
- SCHEER, J. M., RYAN, C. A. (1999) A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell*, 11, 1525-1535.
- SCHIMILLER, A. L., HOWE, G. A. (2005) Systemic signaling in the wound response. *Cur Opin Plant Biol*, 8, 369-377.
- SCHULER, M. A. WERCK-REICHHART, D. (2003) Functional genomics of p450s. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 629-667
- SEO, H. S., SONG, J. T., CHEONG, J. J., LEE, Y. H., LEE, Y. W., HWANG, I., LEE, J. S., CHOI, Y. D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key



- enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 4788-4793.
- SIEDOW, J. N. (1991) Plant Lipxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiol*, 42, 145-188.
- SIMMS, E.L., FRITZ, R. S. (1990) The ecology and evolution of host plant resistance to insects. *Trends Ecol Evol*, 5, 356-360.
- SIQUEIRA-JUNIOR, C. L., FERNANDES, K. V. S., MACHADO, O. L. T., DA CUNHA, M., GOMES, V. M., MOURA, D., JACINTO, T. (2002) 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. *Plant Physiol Biochem*, 40, 247-254.
- SIVASANKAR, S., SHELDRIK, B., ROTHSTEIN, S. (2000). Expression of allene oxide synthase determinates defense gene activation in tomato. *Plant Physiol*, 122, 1335-1342.
- SOMSSICH, I. E., HAHIBROCK, K. (1998) Pathogen defence in plants: a paradigma of biological complexity. *Trends Plant Sci*, 3, 86-90.
- SONG, W. C., BRASH, A. R. (1991) Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science*, 253, 781-784.
- SONG, W.C., FUNK, C.D., BRASH A.R., (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 8519-8523.
- STUMPE, M., GÖBEL, C., DEMCHENKO, K., HOFFMAN, M., KLÖSGEN, R. B., PAWLOWSKI, K., FEUSSNER, I. (2006) Identification of an allene oxide shytase (CYP74C) that leads to formation of α -ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *Plant J*, 47, 883-896



- THOMMA, B. P., NELISSEN, I., EGGERMONT, K., BROEKAERT, W. F. (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J*, 19, 163-171.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-4680.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4350-4353.
- TRANBARGER, T., FRANCESCHI, V., HILDEBRAND, D., GRIMES, H. (1991) The soybean 94 kilodalton protein is a lipoxygenase that is localized in paravenial meophyl cell vacuoles. *Plant Cell*, 3, 973-987.
- UTSUNOMIYA, Y., NAKAYAMA, T., OOHIRA, H., HIROTA, R., MORI, T., KAWAI, F., UEDA, T. (2000) Purification and inactivation by substrate of na allene oxide synthase (CYP74) from corn (*Zea mays* L.) seeds., *Phytochemistry*, 53, 319-323.
- VAN DER BIEZEN, E. A. (2001) Quest for antimicrobial genes to engineer disease resistant crops. *Trends plant sci*, 6, 89-91.
- VICK, B. A. (1991) A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids*, 26, 315-320.
- VICK, B. A. ZIMMERMAN, D. C. (1987) Pathways of fatty acid hidroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiology*, 85: 1073-1078.
- WANG, C., AVDIUSHKO, S., HILDEBRAND, D. (1999) Overexpression of a cytoplasm-localized allene oxide synthase promotes the wound-induced accumulation of jasmonic acid in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 40, 783-793.

- WASTERACK, C. PARTHIER, B. (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci*, 2, 302-307.
- WASTERACK, C., MIERSCH, O., KRAMELL, R., HAUSE, B., WARD, J., BEALE, M., BOLAND, W., PARTHIER, B., FEUSSNER, I. (1998) Jasmonic acid: biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Fett Lipid*, 100:139-146.
- WASTERACK, C., STENZELA I., HAUSE, B., HAUSE, G., KUTTER, C., MAUCHER, H., NEUMERKEL, J., FEUSSNER, I., MIERSCH, O. (2006) The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. *J Plant Physiol*, 163, 297-306.
- WEBER, H. *et al.*, (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 10473–10478.
- WEICHERT, H., STENZEL, I., BERNDT, H., WASTERACK, C., FEUSSNER, I. (1999) Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS letter*, 464, 133-137.
- WEILER EW., ALBRECHT, T. GROTH, B., XIA Z-Q., LUXEM, M., LIB, H., ANDERT, L., SPENGLER, P. (1993) . Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry*, 32, 591 – 600.
- WITTSTOCK, U., GERSHENZON, J. (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Cur Opin Plant Biol*, 5, 300-307.
- ZIEGLER, J., KEINANEN, M. BALDWIN, I. T. (2001) Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuate*. *J Phytochem*, 58, 729-738.

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](#)