

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE INIBIDORES DE TRIPSINA
DO TIPO KUNITZ ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE DEFESA DO
MARACUJAZEIRO (*Passiflora Edulis* Sims) VIA JASMONATOS**

DALVANIA PINHO DOMINGUES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO–UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

FEVEREIRO DE 2018

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE INIBIDORES DE
TRIPSINA DO TIPO KUNITZ ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE
DEFESA DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora Edulis* Sims) VIA
JASMONATOS**

DALVANIA PINHO DOMINGUES

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

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO–UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

FEVEREIRO DE 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

D671 Domingues, Dalvania Pinho.

Análise da expressão gênica de inibidores de tripsina do tipo Kunitz envolvidos na resposta de defesa do maracujazeiro (*Passiflora Edulis Sims*) via jasmonatos / Dalvania Pinho Domingues. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

50 f. : il.

Bibliografia: 3 - 50.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2018.

Orientadora: Tania Jacinto Freitas da Silva.

1. Maracujazeiro. 2. Inibidores de protease serínica do tipo Kunitz. 3. PCR em tempo real. 4. Clonagem gênica. 5. Análise molecular. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE INIBIDORES DE
TRIPSINA DO TIPO KUNITZ ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE
DEFESA DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora Edulis* Sims) VIA
JASMONATOS**

DALVANIA PINHO DOMINGUES

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

Aprovada em

Banca examinadora:

Dra. Hérika Chagas Madureira – IFRJ Pólo São Gonçalo

Dr. João Carlos de Aquino Almeida – LFBM – CBB – UENF

Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão – LBCT – CBB – UENF

Dra. Tânia Jacinto Freitas da Silva (orientadora) – LBT – CBB – UENF

Dedico esta conquista á minha mãe

Luzia Pinho Domingues.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente por ter me iluminado e dado forças para seguir em frente e nunca desistir apesar das dificuldades no caminho.

À minha mãe Luzia por me incentivar, dar forças e apoiar para continuar sempre.

Às amigas Maryna, Natália, Gabriela, Sâmella e Viviane pelos momentos de alegria, descontração e aventura.

À professora Cristina Maria Magalhães de Souza que no início de minha graduação sempre me incentivou a progredir.

À professora Dra. Tânia Jacinto Freitas da Silva, pela orientação.

Às técnicas do LBT Zila, Rívea e Telma por sempre estarem prontas para ajudar.

Ao Prof. Dr André de Oliveira Carvalho pela colaboração com os experimentos de RT-PCR e ao Prof Dr. Francisco José Alves Lemos por gentilmente ceder o termociclador para os experimentos de RT-PCR e digestão de plasmídeos.

À Profa. Dra.. Ana Carolina Paulo Vicente e seu grupo de pesquisa da Fiocruz, por realizarem o sequenciamento dos clones obtidos.

Ao Prof. Dr Álvaro Fabrício Lopes Rios e a Paula Magnelli pelo equipamento em auxílio nos experimentos de qRT-PCR.

Aos membros da banca examinadora por terem aceito esta tarefa.

À revisora Beatriz dos Santos Ferreira, pela dedicação e todo ensinamento durante as correções.

Enfim a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes durante a minha caminhada e contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 O maracujazeiro	3
1.2 A importância econômica da cultura do maracujá	4
1.3 Mecanismos de defesa vegetal	5
1.4 Defesas Vegetais baseadas em jasmonatos	7
1.5 Via do Octadecanóide	9
1.6 Controle da expressão de genes responsivos a JA	12
1.7 Inibidores de proteases	13
1.8 Inibidores de proteases serínica	14
1.9 Inibidores de proteases serínica tipo Kunitz	15
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Material vegetal	20
3.2 Indução de plantas de maracujá com vapores de Metil jasmonato	20
3.2.1 Extração de RNA total de folhas de maracujá – amarelo (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	20

3.2.2	Análise eletroforética de RNAs totais	21
3.2.3	Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)	21
3.3	Clonagem do cDNA da β -actina e do gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH) de maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims) para utilização como controles internos em reações de qRT-PCR	22
3.4	Desenho dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real	24
3.5	Análise de qRT-PCR para inibidores de protease do tipo Kunitz de maracujá	25
4.	RESULTADOS	25
4.1	Clonagem e sequenciamento da β -actina e do GADPH de maracujá	25
4.2	Padronização das condições de amplificação dos genes (<i>PfA</i> , <i>PfB</i> , <i>PfC</i> , <i>PfD</i> , <i>PfE</i> , <i>Pf5</i> , Cys1, LOX, AOS, GADPH e β -actina) para posterior análise por qRT-PCR	27
4.3	Análise da expressão gênica de 3 cDNAs de inibidores de protease serínica do tipo Kunitz	29
5.	DISCUSSÃO	31
6.	CONCLUSÃO	35
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Compostos especializados de plantas	6
Quadro 1	Iniciadores desenhados para utilização nos experimentos de PCR em tempo real	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O maracujazeiro	3
Figura 2	Via das oxilipinas em plantas e animais	7
Figura 3	Via do octadecanóide	9
Figura 4	Percepção de jasmonatos	11
Figura 5	Subdivisão dos inibidores do tipo Kunitz	17
Figura 6	Clonagem dos genes para β -actina e GADPH de maracujá	27
Figura 7	Amplificações dos iniciadores nas condições de 55°C e 60°C	30
Figura 8	Quantificação da expressão relativa dos genes LOX, Cys1, PfA, PfC, PfD e do <i>pool</i> Pf5 em folhas de maracujá tratadas com metil jasmonato durante 12h	31

ABREVIATURAS

12,13-EOT	Ácido 12, 13 (S)-Epoxi-9(Z),11,15 (Z)-Octadecatrienóico
ACX	Acil-CoA Oxidase
AOC	Aleno Óxido Ciclase
AOS	Aleno Óxido Sintase
BPTI	Inibidor de tripsina pancreático bovino
Bt	<i>Bacillus thurigienses</i>
C1	Carbono 1
C11	Carbono 11
C12	Carbono 12
C6	Carbono 6
Ca ²	Cálcio
CABMV	<i>Cowpea aphid mosaic virus</i>
cDNA	DNA complementar
COI1	<i>Coranatine Insensitive 1</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido Etileno Diamino Tetracético
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EST	Expressed Sequence Tags (Etiquetas de sequências expressas)

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPOTE	Hidroperóxido-Octadecatrienóico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPs	Inibidores de Protease
IPTG	Isopropil β -D-thiogalactopiranosídeo
JA	Ácido Jasmônico
JA-Ile	jasmonoil–L–isoleucina
JAZ	<i>JAsmonate Zim domain</i>
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Luria–Bertani
MeJA	Metil Jasmonato
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
Mn ²	Manganês
MYC2	Fator de transcrição que ativa ou reprime genes responsivos á jasmonatos
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NINJA	Novel Interactor of JAZ
OD	Absorbância da amostra
OPC	Oxo-Pentenilciclopentanos
OPDA	Acido 12-Oxo-Fitodienóico

OPR ₃	Ácido 12-Oxo-Fitodienóico Redutase 3
Pb	Pares de bases
PCD	Morte Celular Programada
Pesagro-Rio	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro
PR	Proteínas Relacionadas à Patogênese
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa de RNA seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SCF ^{COI1}	Complexo protéico SKP1, CUL1 e F-box E3 ubiquitina ligase
Serpinas	Serine proteinase inhibitors
TAE	Tris, Ácido Acético, EDTA
TPL	TOPLESS: co-repressores que interagem direta ou indiretamente com fatores de transcrição
UP	Ultra-pura
VOC	Compostos Orgânicos Voláteis
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dgalactopiranosídeo
Zn ²	Zinco
α -LeA	Ácido Linolênico

RESUMO

As plantas respondem as agressões de predadores ativando uma cascata de sinalização, que leva a produção de ácido jasmônico. Esse fitohormônio e seus derivados são fortes indutores da expressão de genes, que codificam proteínas com função defensiva, desempenhando papel central na ativação da resposta de defesa vegetal. Em plantas os inibidores de proteases desempenham dupla função, isto é, tanto a nível defensivo contra o ataque de agressores como no desenvolvimento. Os inibidores podem estar presentes de forma constitutiva em diversos tecidos vegetais, por exemplo, nos órgãos de reserva e órgãos reprodutivos. O Brasil é um grande produtor de maracujá, sendo a maior parte da produção destinada à indústria de sucos. Devido à importância da cultura do maracujá, tal planta foi estudada quanto aos seus mecanismos de defesa dependentes de jasmonatos. Nossos estudos avaliaram inibidores do tipo Kunitz induzidos em resposta a elicitação por metil jasmonato. Para isto plantas de maracujá com 4 semanas, foram expostas a vapores de metil jasmonato durante 12 h. O RNA total das folhas foi extraído, utilizando-se TRIzol. 5 µg do RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA. Inicialmente 5 cDNAs (*PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD* e *PfE*) para inibidores de tripsina do tipo Kunitz foram clonados, a partir de mRNA extraído de folhas de maracujá induzidos por metil jasmonato durante 12h. Os genes para β -actina e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase também foram clonados para serem utilizados como controles internos nas reações de qRT-PCR. A partir das sequências destes genes, iniciadores foram desenhados para análise da expressão dos mesmos, através de PCR em tempo real. Na análise por PCR em tempo real, observamos que o gene *PfA* e *PfD* apresentaram expressão reduzida após o tratamento, enquanto o gene *PfC* teve um incremento de expressão de, pelo menos, 3 vezes em relação ao controle.

Palavras-chave: maracujá, inibidores, Kunitz, metil jasmonato, qRT-PCR.

ABSTRACT

Plants respond to the aggression of predators by activating a signaling cascade, which leads to the production of jasmonic acid. This phytohormone and its derivatives are strong inducers of gene expression, which encode proteins with defensive function, playing a central role in the activation of the plant defense response. In plants, protease inhibitors play a dual role, that is, both defensively against attack by attackers and in development. Inhibitors may be constitutively present in various plant tissues, for example, in the reserve organs and reproductive organs. Brazil is a major producer of passion fruit, with most of the production destined for the juice industry. Due to the importance of passion fruit culture, such plant has been studied for its jasmonate-dependent defense mechanisms. Our studies evaluated Kunitz-type inhibitors induced in response to methyl jasmonate elicitation. For this, passion fruit plants at 4 weeks were exposed to methyl jasmonate vapors for 12h. Total leaf RNA was extracted using TRIzol. 5 µg of total RNA were used for cDNA synthesis. Initially 5 cDNAs (*PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD* and *PfE*) for Kunitz-type trypsin inhibitors were cloned from mRNA extracted from passion fruit leaves induced by methyl jasmonate for 12 h. The genes for β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were also cloned to be used as internal controls in the qRT-PCR reactions. From the sequences of these genes, primers were designed for expression analysis of the same, through real-time PCR. In the real-time PCR analysis, we observed that the *PfA* and *PfD* gene presented reduced expression after the treatment, while the *PfC* gene had an expression increase of at least 3 times in relation to the control.

Keywords : Passion fruit, inhibitors, Kunitz, methyl jasmonate, qRT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O maracujazeiro

O termo maracujá (domínio: *Eukarya*; reino: *Plantae*; divisão: *Magnoliophyta*; classe: *Magnoliopsida*; ordem: *Malphigiales*; família: *Passifloraceae*; gênero: *Passiflora*) é derivado de maraú-ya, que para os indígenas significa “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo”.

A família *Passifloraceae* apresenta plantas trepadeiras, raramente eretas, com folhas alternadas, geralmente simples, lobadas ou não, possuindo gavinhas axilares, estípulas normalmente caducas e nectários extraflorais (Dhawan *et al.*, 2004; Souza e Lorenzi, 2008; Zeraik *et al.*, 2010). As flores do maracujá são hermafroditas, nascem das axilas foliares em brotações novas, tendo cinco sépalas, cinco pétalas e cinco estames, com ovário unilocular, multiovulado, sobre o qual se encontra um estilete com estigma, geralmente, *tripartido*. São protegidas por brácteas foliáceas, possuindo um colorido atraente com abundância de néctar, ocasionando forte atração aos insetos polinizadores (Malerbo-Souza, 2002; Rocha, 2004).

O maracujazeiro encontra-se largamente distribuído nas regiões de clima tropical e subtropical do globo, possuindo 15 gêneros com um total aproximado de 650 espécies (Escobar, 1988), sendo o gênero *Passiflora* com aproximadamente 400 espécies o maior representante da família (Cavichioli *et al.*, 2008).

A primeira espécie de maracujá descrita no Brasil foi a *Passiflora incarnata* L., por Nicolás Monardes, sob o nome de Granadilla, com a primeira referência feita em 1587 na obra Tratado Descritivo do Brasil como “erva que dá fruto” (Rocha, 2004). No país, atualmente, são registrados cinco gêneros com cerca de 120 espécies, sendo 12 delas raras. A maioria produz frutos comestíveis, porém com poucas cultivadas (Souza e Lorenzi, 2008).

As espécies *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo, maracujá-amarelo, maracujá-roxo, maracujá-preto) (Figura 1A e 1B) e *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce) (Figura 1C e 1D) são as mais cultivadas no Brasil (Malerbo-Souza *et al.*, 2002; Bernacci *et al.*, 2003; Meletti, 2011).



Figura 1: O Maracujazeiro: (A) Flor do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) e (B): fruto maturo. disponível em: www.camaramuqui.es.gov.br, acesso em 20 de dezembro de 2017. (C) Flor do maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) e (D) fruto maturo. disponível em: www.florabeijaflor.com.br, acesso em 20 de dezembro de 2017.

1.2 A importância econômica da cultura do maracujá

A fruticultura vem se consolidando como um dos principais setores da economia brasileira por possuir grande potencial de geração de emprego e renda. O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de frutas tropicais e o terceiro país produtor de frutas, dentre estas o maracujá vem sendo cultivado em grande parte do país. Isto se deve as condições climáticas altamente favoráveis e a rápida produção do maracujazeiro comparando-a com outras frutíferas (Pires *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010).

Dentre as espécies de maracujazeiro cultivadas no país, o maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) está presente em 97% da área total plantada e do volume comercializado. Em torno de 60% da produção é destinada ao consumo *in natura*, e

o restante, às indústrias de processamento, sendo o suco o principal produto (Cavichioli *et al.*, 2008).

O maracujazeiro apresenta importância devido às características físico-químicas e fármaco-terapêuticas de suas folhas, sementes e raízes. É popularmente utilizado nas Américas e Europa no tratamento para ansiedade, insônia e irritabilidade (Dhawan *et al.*, 2001; Akhondzadeh *et al.*, 2001; Cavichioli *et al.*, 2008; Zeraik *et al.*, 2010).

O fruto também possui valor medicinal, sendo fonte de compostos antioxidantes, devido à presença de polifenóis, principalmente flavonóides (Zeraik *et al.*, 2010). A aplicação do maracujá também tem sido estudada para o tratamento contra dependência a canabinóides (Dhawan e Sharma, 2003), diminuição da resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (Queiroz *et al.*, 2012) e alcoolismo crônico (Carlini *et al.*, 2006).

Os subprodutos (cascas e sementes) do processamento do fruto podem ser utilizados na alimentação humana ou animal. As cascas possuem fibras solúveis (pectina), além de ricas em niacina, ferro, cálcio e fósforo. Das sementes obtém-se o óleo altamente atraente para as indústrias cosméticas devido ao seu alto teor de ácidos graxos (Zeraik *et al.* 2010; Espírito-Santo *et al.*, 2013). O maracujá possui ainda potencial para uso em ornamentação, conferido por suas belas flores atrativas pelo tamanho, exuberância de cores e originalidade de formas (Peixoto, 2005).

A cultura, no entanto é atacada por diversos agentes, como: insetos representados pelas lagartas desfolhadoras (*Dione juno juno* e *Agraulis vanillae vanillae*), moscas-das-frutas, broca-do-maracujazeiro (*Philonis passiflorae*), pulgões, vaquinhas, percevejos e ácaros, bem como por bactérias, vírus, fungos e nematóides. Estes ataques são considerados fatores limitantes para a produção, pois causam danos consideráveis à cultura e, exigem grande atenção por parte dos agricultores (Rocha, D, 2004; Boiça-Júnior *et al.*, 2008).

No ano 2000, esta cultura foi escolhida para integrar o programa Moeda Verde - FRUTIFICAR, pelo governo do Estado. Este programa visava o aumento da produção e produtividade de frutíferas, através de linhas de crédito específicas para financiamento de projetos de fruticultura irrigada (EMATER-RIO, 2018).

Todavia em função de diversos problemas, a Região Sudeste e, mais especificamente, o Estado do Rio de Janeiro não acompanhou a tendência nacional

de crescimento na produção de maracujá, apresentando considerável queda a partir de 2004 (Pires *et al.*, 2009). A produção no Estado continuou abaixo na produtividade regional, sendo Minas Gerais, o maior produtor do Sudeste, responsável por 20% da produção em 2016, enquanto o Rio de Janeiro representou apenas 3% (IBGE, 2018).

Para discutir sobre a cultura na região Norte fluminense, foi realizado no ano de 2014, na UENF um workshop que reuniu especialistas e visava a apresentação de manejos e tratos culturais, incluindo nova cultivar para a região, resistente ao CABMV (*Cowpea aphid mosaic virus* – vírus do endurecimento do fruto), até a adoção de novas tecnologias em desenvolvimento pela Pesagro-Rio, Embrapa e na própria UENF aos produtores da região (Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento. Disponível em: <http://www.rj.gov.br/web/seapec/exibeconteudo?article-id=2217392> acesso em 10 de janeiro de 2018).

1.3 Mecanismos de defesa vegetal

Ao longo do seu ciclo de vida, as plantas são desafiadas por agentes causadores de estresse representados, em particular, pelos organismos heterotróficos, que dependem da energia fixada por elas. Como organismos sésseis, as plantas não têm chance de escapar destes ataques, devendo empregar diversos mecanismos para se defender (Frost *et al.*, 2008). Estratégias variadas foram desenvolvidas ao longo do tempo, uma delas baseia-se na capacidade de sintetizar metabólitos especializados (Tabela 1), que evoluíram em resposta a determinados desafios ecológicos. Atualmente, são descritos mais de 200.000 metabólitos produzidos por plantas (Dicke *et al.*, 2003; Mithofer e Boland, 2012). Outra estratégia é a síntese de proteínas relacionadas à defesa, como os inibidores de proteases (Tabela 1). Assim, as plantas conseguem modular respostas de defesa, retornando ao metabolismo normal (Shah, 2009).

Compostos	Exemplo	Fonte vegetal	Total
Terpenóides	(E)- β -Farneseno	Ubíqua	> 30.000
Esteróides	Fitoecdisona	Ranunculaceae	~ 200
Cardenolídeos	Digoxigenina	Plantaginaceae	~ 200
Alcalóides	Nicotina	Solanaceae	> 12.000
Derivados de ácidos graxos	(3Z)-Hexenilacetato	Ubíqua	n.d.
Glucosinolatos	Sinigrina	Capparales	~ 150
Glicosídeos Cianogênicos	Dhurrina	Rosaceae, Fabaceae	~ 60
Fenólicos	Lignina, taninos	Ubíqua	~ 9.000
Sílica	SiO ₂	Poaceae	1
Polipeptídeos	Inibidores de Proteases	Ubíqua	n.d.

Tabela 1: Compostos especializados para defesa em plantas. (n.d.) não determinado. Modificado de Mithofer e Boland, 2012.

Em princípio, duas grandes categorias de defesa vegetal podem ser distinguidas: a constitutiva, que está sempre presente e a induzida, que é especificamente produzida em resposta a certos estímulos. A defesa constitutiva compõe a primeira linha de resposta do organismo, é aquela que a planta possui independente de sofrer injúria. Sendo assim, existem as barreiras físicas, representadas pelas estruturas anatômicas como parede celular, tricomas, cera, cutícula, espinhos, altos níveis de lignificação, e as químicas, representadas por compostos que podem ser tóxicos, antidigestivos ou impalatáveis ao agressor, como saponinas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (Léon *et al.*, 2001; Morant *et al.*, 2008; Iriti e Faoro, 2009).

As defesas induzidas são disparadas após a planta sofrer uma agressão e incluem produtos do metabolismo secundário, mudanças morfológicas e fisiológicas. Algumas reações geradas podem ocasionar modificações da parede celular, produção de fitoalexinas, peroxidases, inibidores de proteases (IPs), e compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Figura 2). Os inibidores de proteases atuam diretamente no metabolismo do inseto, já os VOCs podem atrair organismos a partir de um nível trófico adicional, por exemplo, predadores naturais dos herbívoros que atacam a planta (Heath, 2000; Mello e Silva-Filho, 2002; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Heil e Bueno, 2007; Llandres *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2013).

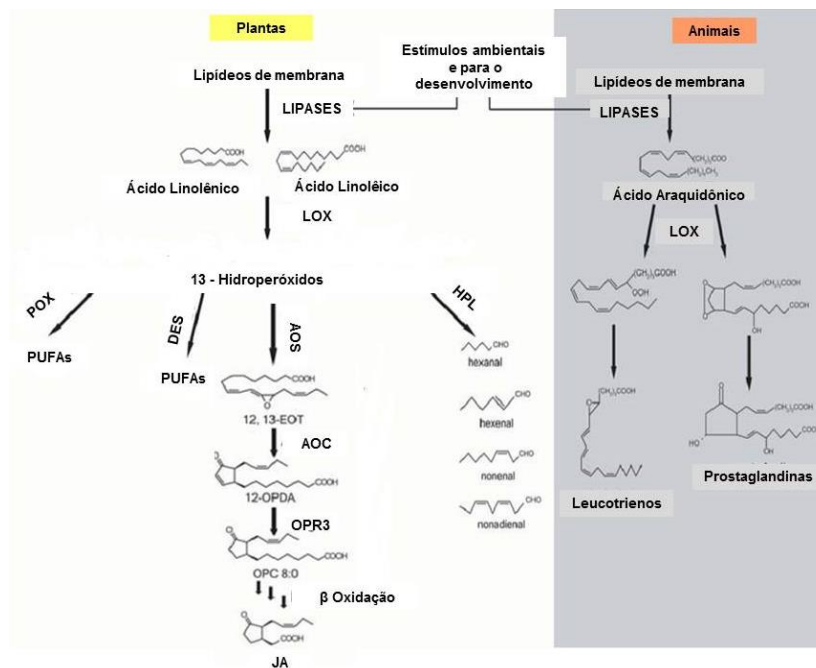


Figura 2: Via das Oxilipinas em plantas e animais. Em plantas, a via das oxilipinas utiliza o ácido linolênico ou linoléico para a geração de hidroperóxidos, que serão substratos para quatro ramos da mesma (POX, DES, AOS e HPL). A via AOS produz compostos bioativos, como o ácido jasmônico (JA). Em animais a via emprega o ácido araquidônico para a produção de hidroperóxidos, subseqüentemente utilizado como substrato para o síntese de compostos bioativos, como prostaglandinas e leucotrienos. POX: Peroxigenase; DES: Divinil Éter Sintase; AOS: Aleno Óxido Sintase; HPL: Hidroperóxido Liase; LOX: Lipoxigenase; AOC: Aleno Óxido Ciclase; OPR3: Ácido 12–13–Oxo–Fitodienóico Redutase 3; PUFAs: Ácidos Graxos Poliinsaturados Oxidados; 12,13-EOT: Ácido 12, 13 (S)-Epoxi-9(Z),11,15 (Z)-Octadecatrienóico; OPC: Oxo-Pentenilciclopentanos. Modificado de Chehab *et al.*, 2007.

1.4 Defesas vegetais baseadas em jasmonatos

O ácido jasmônico (JA) e seus derivados, coletivamente denominados jasmonatos, são produtos de uma das vias das oxilipinas, sintetizados a partir de ácidos graxos poliinsaturados (Shah, 2009). São encontrados largamente distribuídos nos tecidos vegetais (Geyter e et al., 2012) e estão presentes em algas, musgos e fungos, sendo estruturalmente similares a prostaglandinas animais (Figura 2) (Wasternack, 2007; Fonseca *et al.*, 2009).

O ácido jasmônico e seu metil éster, o Metil Jasmonato (MeJA) foram, isolados pela primeira vez do óleo essencial de jasmim (*Jasminum grandiflorum*), em 1962 (Wasternack, 2007). Em 1990, Farmer e Ryan demonstraram que o MeJA funciona como eliciador da defesa vegetal, pois quando aplicado em plantas de tomate estimularam a síntese de inibidores de proteases tanto em plantas tratadas, quanto em plantas não tratadas, agindo como um sinal volátil para comunicação. Em 2009, Shah demonstrou que o MeJA é translocado pelo sistema vascular da planta.

Os níveis de JA encontrados em uma planta variam de acordo com sua função no tecido ou célula, do estágio de desenvolvimento da planta e da resposta a diferentes estímulos ambientais. Tal metabólito está envolvido na resposta de sinalização celular á estresse biótico e abiótico como: defesa contra insetos e patógenos, radiação ultravioleta, ozônio, estresse hídrico, salinização do solo, ascensão e queda de temperatura e ocorrência de metais pesados (Creelman e Mullet, 1997).

Em plantas saudáveis o JA está envolvido na mecanotransdução, senescência, crescimento de raízes, desenvolvimento de gavinhas e no desenvolvimento reprodutivo (Browse, 2009; Radhika *et al.*, 2010; Mosolov e Valueva, 2011). Nas flores o JA participa nos processos de desenvolvimento, como desenvolvimento de pólen, deiscência da antera, esterilidade, secreção de néctar e de néctar extrafloral, além de defesa (Radhika *et al.*, 2010).

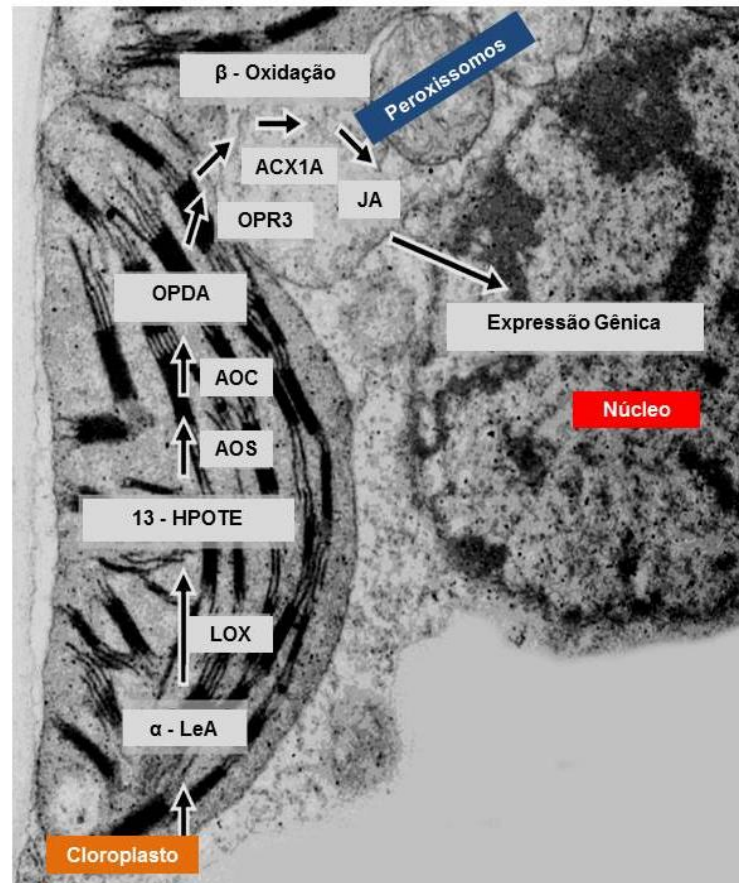


Figura 3: Via do octadecanóide. Compartimentos celulares envolvidos na síntese de ácido jasmônico. α -LeA: ácido linolênico; LOX: lipoxigenase; 13-HPOTE: 13-hidroperóxido-octadecatrienóico; AOS: aleno óxido sintase; AOC: aleno óxido ciclase; OPDA: ácido oxofitodienóico; OPR3: ácido 12-oxofitodienóico redutase 3; ACX: acil-CoA redutase; JA: ácido jasmônico; 12, 13(S)-EOT: Ácido 12, 13(S)-Epoxi-9(Z),11, 15 (Z)-Octadecatrienóico Modificado de Wasternack, 2007.

1.5 Via do Octadecanóide

O JA e os jasmonatos são sintetizados na via do octadecanóide, que possui essa denominação devido ao precursor da via o ácido linolênico (α -LeA, 18:3), possuir 18 carbonos (C) (Shah, 2009). Tal via foi exaustivamente estudada com o auxílio de mutantes de plantas silenciados para diversas enzimas na via. Como pode ser observado na Figura 3: o substrato inicial é o ácido linolênico (α -LeA) liberado de galactolipídios plastidiais por fosfolipases. Em seguida, o α -LeA é oxidado pela 13-lipoxigenase (LOX), gerando o ácido 13-hidroperóxido-octadecatrienóico (13-HPOTE), metabolizado por diferentes classes de oxilipinas. A conversão do 13-

HPOTE a ácido 12, 13 (S)-Epoxi-9(Z),11,15 (Z)-Octadecatrienóico [12,13 (S)-EOT] pela catálise da aleno óxido sintase (AOS) é o primeiro passo que direciona para a formação de JA. O 12,13(S)-EOT é ciclizado enzimaticamente pela aleno óxido ciclase (AOC) a ácido 12-13-oxo-fitodienóico (OPDA), que deixa o cloroplasto e segue para o peroxissomo. No peroxissomo, OPDA é reduzido pela OPDA redutase 3 (OPR3) e passa por duas ou três rodadas de β -oxidação catalisadas pela enzima acil-CoA oxidase (ACX), levando à geração de JA (Wasternack e Xie, 2010; Kombrink, 2012).

Os jasmonatos estão sujeitos a várias transformações enzimáticas, podendo gerar derivados com diferentes atividades biológicas. Entre as modificações principais do JA estão: a) metilação do carbono 1 (C1) para formar o MeJA que é altamente volátil, ativo na comunicação entre plantas; b) descarboxilação do C1 para formar outro composto volátil, o *cis-jasmone*; c) hidroxilação no C12 ou C11 para formar o ácido tuberônico e derivados, que podem ser modificados por glicosilação; d) redução no C6 para gerar ácido cucúrbico; e) conjugação com aminoácidos como valina, leucina e isoleucina [jasmonoil-L-isoleucina (JA-Ile), forma ativa natural] (Browse, 2009; Kombrink, 2012).

A fim de esclarecer quais proteínas estão envolvidas na via do octadecanóide em maracujá, foi identificada e purificada em nosso grupo uma 13-LOX, localizada em cloroplastos de folhas de maracujazeiro (Rangel *et al.*, 2002). Em 2010, Jardim *et al.*, demonstrou o acúmulo de transcritos para a enzima LOX na folha após tratamento com MeJA, ferimento mecânico e herbivoria causada por um inseto especialista (*Agraulis vanillae vanillae*), e outro generalista (*Spodoptera frugiperda*). Siqueira-Júnior *et al.* (2008) caracterizou ainda o cDNA que leva a síntese de uma AOS cloroplasmática, induzida por ferimento mecânico e MeJA em maracujá. Em 2008, Botelho-Júnior *et al.* demonstrou a acumulação de inibidores de tripsina em folhas de maracujá após tratamento com MeJA e herbivoria. Subsequentemente, Pereira *et al.* (2011) verificou o acúmulo diferencial de inibidores de protease serínicos do tipo Kunitz e cisteínicos, durante o desenvolvimento floral em maracujá e em órgãos da flor em antese. Já em 2014, Botelho-Júnior *et al.* observou a capacidade do maracujazeiro em sintetizar diversos inibidores do tipo Kunitz, assim como o recrutamento de dois dos caracterizados, que se mostraram ativos contra

proteases cisteínicas presentes no intestino médio do caruncho, *C. maculatus* (um inseto coleóptero), sugerindo a utilização destas proteínas como bioinseticidas.

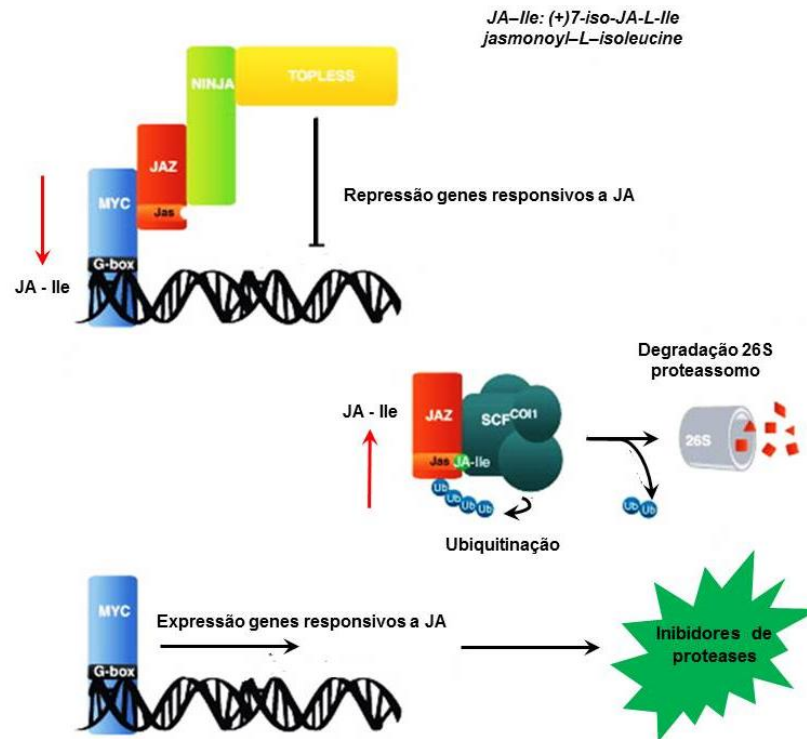


Figura 4: Percepção de jasmonatos. Em baixos níveis de JA-Ile, fatores de transcrição (MYC2) são ligados a sequência promotora do gene jasmonato-responsivo (G-box), sendo reprimida pela interação com proteínas JAZ (*JASmonate ZIM domain*), sua proteína adaptadora NINJA (*Novel Interactor of JAZ*) e seu co-repressor TPL (*TOPLESS*). Após um estresse, o bioativo (+)7-iso-JA-L-Ile acumula-se rapidamente e liga-se a seu receptor, o COI1 (*Coronatine Insensitive 1*, proteína F-box), que faz parte do complexo SCF^{COI1} (SKP1, CUL1 e F-box E3 ubiquitina ligase). Em seguida proteínas JAZ são recrutadas a partir de seu local de ligação inicial no complexo SCF^{COI1} e são ubiquitinadas. Após a poliubiquitinação as JAZ são degradadas pelo 26S proteassomo, o que leva a desmontagem do complexo repressor, com ativação de fatores de transcrição (MYC2) e expressão de genes de resposta mediada por JA. Modificado de Geyter *et al.*, 2012.

1.6 Controle da expressão de genes responsivos a JA

A indução e a formação de jasmonatos, em condições de estresse, são seguidas pela expressão de diversos genes, que codificam inibidores de proteases, tioninas e defensinas. Tais proteínas aumentam o status de defesa da planta, juntamente com os jasmonatos (Wasternack *et al.*, 2000).

Jasmonatos atuam como indutores conservados no metabolismo secundário vegetal, a percepção destes metabólitos desencadeia uma extensa reprogramação transcricional, ocasionando à ativação de vias metabólicas inteiras. Ao mesmo tempo, tornou-se claro que toda reprogramação metabólica está sujeita a mecanismos de controle complexos integrados em redes celulares robustas (Kallenbach *et al.*, 2010; Geyter *et al.*, 2012).

Em estado de repouso, quando o nível de JA-Ile é baixo, fatores de transcrição (por exemplo, MYC2) são ligados a sequência promotora do gene jasmonato-responsivo (por exemplo, G-box), sendo reprimida pela interação com proteínas JAZ (*JAsmonate ZIM domain*), que interage com a proteína adaptadora NINJA (*Novel Interactor of JAZ*) e seu co-repressor TPL (*TOPLESS*) (Figura 4). Após a estimulação por estresse, o bioativo (+)-7-iso-JA-L-Ile acumula-se rapidamente e se liga ao receptor de jasmonato COI1 (*Coronatine Insensitive 1*, proteína F-box), que faz parte do complexo SCF^{COI1} (SKP1, CUL1 e F-box E3 ubiquitina ligase). Proteínas JAZ são recrutadas a partir de seu local de ligação inicial no complexo SCF^{COI1} e são ubiquitinadas. Após a poliubiquitinação as JAZ são degradadas pelo 26S proteassomo, o que leva a desmontagem do complexo repressor, com ativação de fatores de transcrição (MYC2, por exemplo) e expressão de genes de resposta mediada por JA (Figura 4) (Wasternack, 2007; Wasternack e Xie, 2010; Avanci *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2010; Gfeller *et al.*, 2010; Geyter *et al.*, 2012).

1.7 Inibidores de proteases

Durante o processo evolucionário, as plantas adquiriram mecanismos de defesa, que permitem combater pragas e doenças. Várias proteínas integram estes mecanismos como as 1,3- β -glucanases, quitinases, proteases, lectinas, inibidores de enzimas, entre outras, que exibem atividade antimicrobiana (Mosolov *et al.*, 2001).

As proteases são responsáveis pela clivagem proteolítica de ligações peptídicas, sendo uma das mais frequentes e importantes modificações pós-traducionais. As peptidases são proteases que recebem o prefixo endo quando clivam ligações no meio de cadeias polipeptídicas, podendo, neste caso, serem chamadas de proteinases, e o prefixo exo quando clivam ligações em uma das extremidades da cadeia polipeptídica, compreendendo as chamadas aminopeptidases e carboxipeptidases. Tais enzimas participam de mecanismos metabólicos essenciais para o processamento e ciclagem de proteínas e estão presentes em vários processos de desenvolvimento celular, além de participarem na interação de plantas com outros organismos, como na infecção por patógenos e na digestão de proteínas vegetais por herbívoros, sendo encontradas em plantas, animais e micro-organismos (Chye *et al.*, 2006).

A regulação de proteases é um componente integral para processos bioquímicos essenciais como crescimento, desenvolvimento e respostas de defesa (Koiwa *et al.*, 1997). (Para este controle foram desenvolvidos muitos mecanismos, sendo dois predominantes: a) o primeiro deles consiste no fato de que quase todas as proteases são biossintetizadas como precursores inativos chamados pró-proteínas ou zimogênios, esses são armazenados e ativados por proteólise somente quando necessário. b) outro mecanismo é necessário para controlar a enzima uma vez ativada, isso é providenciado pela presença de proteínas conhecidas como inibidores de proteases (IPs), que formam complexos completamente inativos ou parcialmente ativos com suas enzimas cognatas (Laskowski e Kato, 1980).

Os IPs são encontrados em todos os eucariotos e possuem importante papel na regulação de muitos processos biológicos como apoptose, ciclo celular, sistemas de coagulação e rotas de processamento de hormônios. Também são importantes no tratamento de patologias humanas como inflamação, hemorragias e câncer (Lingaraju e Gowda, 2008), sendo o seu principal papel limitar a atividade de

proteases (Gubb *et al.*, 2010). Eles são genericamente categorizados de acordo com a classe de proteases a qual inibem (Koiwa *et al.* 1997) e o resíduo de aminoácido presente no seu sítio reativo. Deste modo, são divididos em: serínicos (serina e histidina), cisteínicos (cisteína), aspárticos (grupo aspartato) e metaloproteases (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) (Carlini *et al.*, 2002). Até o momento, 99 famílias de IPs foram reconhecidas com base em suas similaridades de sequências de acordo com o banco de dados de peptidases *Merops* (disponível em: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family> acesso em 10 de janeiro de 2018).

Em plantas superiores os IPs estão presentes em muitas espécies de legumes, cereais e solanáceas com importância econômica (Chye *et al.*, 2006). Diferentes papéis têm sido sugeridos para os IPs em plantas, incluindo ação como proteínas de reserva, reguladores endógenos de atividades proteolíticas (Ryan, 1990) ou participando em diversos processos no desenvolvimento como a morte celular programada (PCD), como também associados à resistência a insetos e patógenos (Carlini *et al.*, 2002). Estes podem ser sintetizados constitutivamente durante o desenvolvimento normal da planta ou serem induzidos em resposta a herbivoria e ataque de patógenos (Ryan, 1990).

O mecanismo de ação dos IPs se dá através de interações intramoleculares como pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e hidrofóbicas, formando complexos estáveis com proteases. No caso de estresse biótico os IPs se ligam ao trato digestivo de insetos herbívoros, dificultando a proteólise e levando a morte dos mesmos, tendo uma importante função na defesa vegetal (Ee *et al.*, 2009), já que muitos insetos usam uma combinação de proteases serínicas, cisteínicas e aspárticas como enzimas digestivas (Koiwa *et al.*, 1997).

1.8 Inibidores de proteases serínica

Os inibidores de proteases serínicos, também chamados serino-proteases, são inibidores competitivos, que possuem mecanismos de ação semelhantes (Ryan, 1990). As serino-proteases inibem tripsina, quimiotripsina e α -amilase. Muitas destas proteínas são bifuncionais, inibindo tanto tripsina quanto α -amilase. A acumulação de inibidores serínicos ocorre em sementes, durante a maturação de tubérculos, sugerindo que estes facilitam a acumulação de proteínas de estocagem pela atenuação da atividade de proteases. Tais inibidores também são acumulados como

resposta de defesa, tanto no sítio do ferimento (local), quanto em locais distantes (sistêmica) (Koiwa *et al.*, 1997).

Em plantas, a classe das serino-proteases é subdividida em oito famílias, com base na seqüência primária de proteínas e fonte. São elas: Inibidores da família Kunitz, Bowman-Birk, *Potato I*, *Potato II*, *Squash*, família de inibidores de tripsina da cevada, do milho (Ragi I-II) e serpinas (*serine proteinase inhibitors*). Apesar das famílias possuírem seqüências primárias e estruturas diferentes, os mecanismos de catálise e estrutura do local de reação do inibidor da protease serínica são bem conservados, com exceção das proteínas da família das serpinas (Koiwa *et al.*, 1997).

As serino-proteases inibidoras de tripsina, pertencentes as famílias *Solanaceae*, *Leguminosae* e *Gramineae* vem sendo investigadas por representarem importantes fontes de alimentos (Tremacoldi e Pascholati, 2004), adicionalmente, tem sido observado seu papel na dormência das sementes e na proteção contra insetos e predadores microbianos (Lingaraju e Gowda, 2008). Dentre os inibidores serínicos os mais estudados são os do tipo Kunitz e Bowman-Birk, por estarem presentes em plantas de interesse agrícola (Bode e Huber, 1992). Eles diferem entre si em massa molecular, teor de ligação dissulfeto, estrutura tridimensional, estabilidade ao calor e a agentes desnaturantes (Kang *et al.*, 2009).

Atualmente, as plantas podem ser transformadas com genes de inibidores associados a fortes promotores para expressá-los em níveis relativamente altos em intervalos de tempos específicos. A expressão destes pode ocorrer em tecidos particularmente vulneráveis ao ataque, como sementes, ou induzidos através de ferimentos no tecido atacado pela mastigação, como as folhas. Em algumas plantas transgênicas, ainda não comercializadas, os inibidores vêm sendo utilizados em conjunto com toxinas Bt (*Bacillus thuringiensis*) (Mosolov e Valueva, 2008) reforçando sua ação contra fitopatógenos.

1.9 Inibidores de proteases serínica do tipo Kunitz

O primeiro inibidor serínico do tipo Kunitz isolado foi o BPTI (inibidor de tripsina pancreático bovino), em 1936 por Moses Kunitz (Renko *et al.*, 2012). Em plantas, estes inibidores estão concentrados em sementes de leguminosas das subfamílias taxonômicas *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae*.

Os inibidores do tipo Kunitz consistem em proteínas com 18 a 24 KDa, uma ou duas cadeias polipeptídicas, duas pontes dissulfeto, sítio reativo único com um resíduo de arginina (Arg, R) ou lisina (Lys, K) e quatro resíduos de cisteína em um *loop*. A conformação canônica deste *loop* é importante para um posicionamento adequado e uma adaptação efetiva ao sítio ativo da enzima proteolítica. No entanto, podemos encontrar inibidores com apenas dois, um ou até mesmo nenhum resíduo cisteínico (Lingaraju e Gowda , 2008; Oliva *et al.*, 2010).

Em geral, os inibidores serínicos do tipo Kunitz se comportam como pseudo-substratos, sua especificidade é definida pelo aminoácido presente na posição P1 do inibidor (Carlini *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2009). O estudo cristalográfico destes inibidores revela uma estrutura terciária globular composta por 12 folhas β -pregueadas antiparalelas, levando a formação de seis harpinas. Três destas harpinas estão interligadas por longos *loops* formando uma estrutura em barril denominada β -*trefoil fold*, a qual se atribui a alta afinidade de ligação destes inibidores com suas enzimas alvo (Murzin *et al.*, 1992; Krowarsch *et al.*, 2003; Renko *et al.*, 2012).

Com base no conteúdo de cisteínas, os Kunitz podem ser subdivididos em três grupos (Figura 5). No grupo 1, temos aqueles que possuem 4 resíduos de cisteína, formando 2 pontes dissulfeto intra ou intermoleculares. No grupo 2, encontramos Kunitz que possuem 2-3 resíduos, sendo capazes de formar uma ponte. No grupo 3, estão os Kunitz que possuem um ou nenhum resíduo de cisteína, logo são incapazes de formar pontes dissulfeto (Leung *et al.*, 2013).

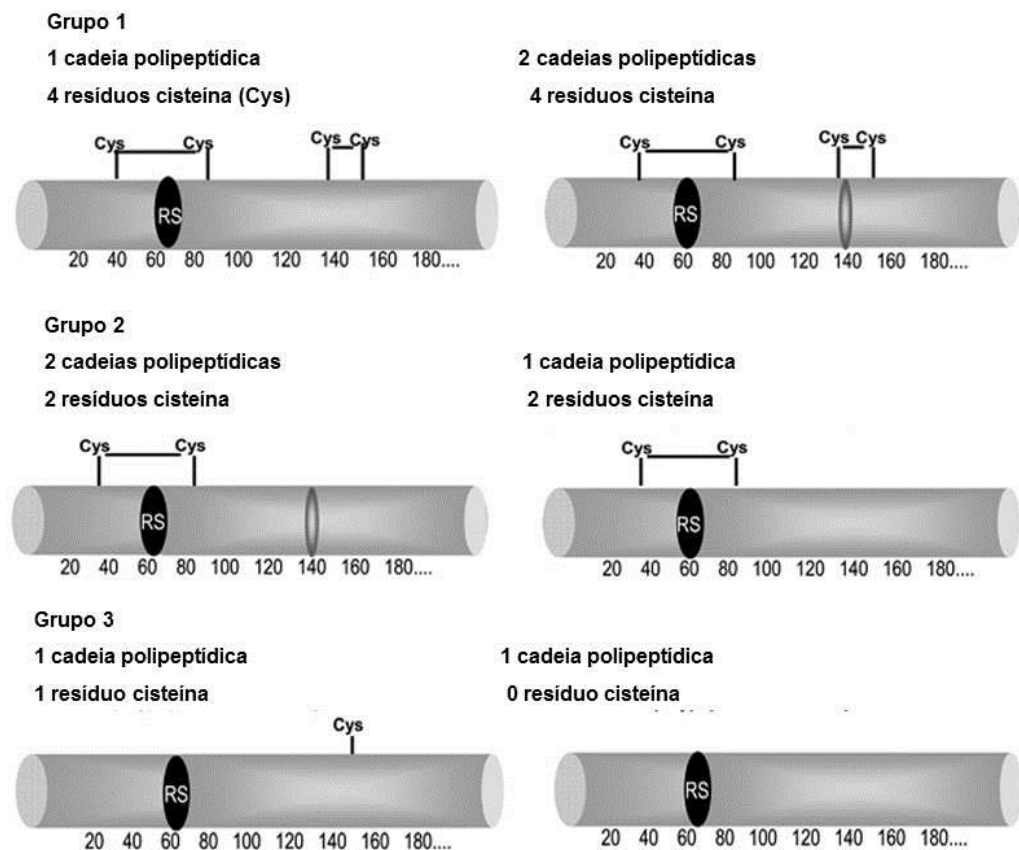


Figura 5: Subdivisão dos inibidores do tipo Kunitz. De acordo com o conteúdo de resíduos de cisteína tais inibidores são divididos em 3 grupos. Modificado de Oliva *et al.*, 2010.

Proteínas pertencentes à família Kunitz possuem em sua região N-terminal uma assinatura comum (*Kunitz signature motif*). Uma assinatura típica consiste na seguinte sequência: [LIVM]–x–D–{EK}–[EDNTY]–[DG]–[RKHDENQ]–x–[LIVM]–x–{E}–{Q}–(x)2–Y–x–[LIVM]. Este motivo é semelhante ao primeiro inibidor do tipo Kunitz descrito em plantas, o inibidor de soja, no entanto tal motivo pode sofrer modificações de acordo com diferenças genéticas entre famílias de plantas (Lam *et al.*, 1999; Patil *et al.*, 2012).

A família Kunitz compreende proteínas com atividade inibitória contra várias enzimas proteolíticas, como as serínicas, cisteínicas e aspárticas (Christeller, 2005; Oliva *et al.*, 2010), logo são consideradas importantes na defesa vegetal contra insetos, pois levam a inibição de proteases digestivas e a absorção inadequada de

aminoácidos essenciais. Como consequência, pode levar a morte do herbívoro por inanição, por isso seu emprego contra pragas agrícolas se tornou pertinente (Mosolov *et al.*, 2001; Rodriguez-Saona *et al.*, 2010; Smigocki *et al.*, 2013).

Portanto, o estudo destes inibidores em nosso modelo, o maracujá, se faz necessário devido a sua capacidade de interação contra as proteases presentes no trato intestinal de diversos herbívoros, que levam a perdas significativas na produção, assim como elevando o custo do produto final.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Este trabalho tem como objetivo principal a caracterização da expressão dos genes *PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD* e *PfE* que codificam para inibidores de protease serínica do tipo Kunitz, clonados em folhas de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) submetidas à vapores de metil jasmonato.

2.2 Específicos:

- Clonagem dos genes β -actina e GADPH de *Passiflora edulis* Sims para utilização como referência em reações de qRT-PCR.
- Análise, através de qRT-PCR, da expressão gênica dos cDNAs para os genes *LOX*, *AOS*, *Cys1*, *PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD* e *PfE* em resposta a exposição, por 12h, á vapores de metil jasmonato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os frutos de maracujá foram adquiridos no mercado local, em Campos dos Goytacazes, norte do estado do Rio de Janeiro. As sementes foram semeadas em copos plásticos para café contendo vermiculita e mantidas em sala de cultivo, sendo regadas com água uma vez ao dia. Depois do aparecimento dos primeiros cotilédones, 3 plantas foram transferidas para cada recipiente plástico de 50mL contendo terra com húmus de minhoca, sendo regadas uma vez por dia com água e a cada três dias com adubo (Ouro Verde), preparado de acordo com as instruções do fabricante. As plantas foram mantidas por 15 a 20 dias em sala de cultivo sob condições normais de luz a $60 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em fotoperíodo de 17h na luz a 28°C e 7h no escuro a 18°C (Rangel *et al.*, 2002).

3.2 Indução de plantas de maracujá com vapores de metil jasmonato

Para cada experimento foram utilizados 3 grupos de plantas (3 recipientes com três plantas cada). Cada grupo contendo plantas com no mínimo quatro folhas de tamanhos similares (com aproximadamente 2 meses). Estas então, foram colocadas em um pote de vidro contendo um pouco de algodão, fixado com fita adesiva, no qual foram aplicados 3 μL de metil jasmonato (95%) (Sigma). O sistema foi deixado por 12 h em fluxo laminar exposto a luz direta. Para o controle foram utilizados também 3 grupos de plantas, porém no algodão foi aplicado 3 μL de água destilada. As plantas controle ficaram sob as mesmas condições que as submetidas ao metil jasmonato.

3.2.1 Extração de RNA total de folhas de maracujá – amarelo (*Passiflora edulis* Sims)

Plantas de maracujá induzidas com vapores de metil jasmonato durante 12 h foram utilizadas neste procedimento. Folhas coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido foram maceradas em almofariz até a obtenção de um pó fino. Para a extração do RNA total o reagente comercial Trizol (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante, como segue: o pó (100 mg) obtido na maceração foi transferido para um microtubo de 1,5 mL com 1 mL de

Trizol até completar 10 % do volume inicial. Essa mistura foi então agitada e incubada por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck), a mistura foi agitada e incubada por 5 min a temperatura ambiente. Após uma centrifugação de 12000 g por 15 min a 4°C, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e precipitada com 500µL de isopropanol (Sigma). A amostra permaneceu 10 min a temperatura ambiente e foi centrifugada a 12000 g por 10 min a 4°C novamente. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol (Merck) 75% (v/v). O precipitado foi ressuspensso em 100 µL de água livre de RNase e DNase (água tratada com dietilpirocarbonato – DEPC). A concentração do RNA total foi estimada por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop®, para tanto, 2 µL de cada solução contendo RNA total foram utilizados. A absorbância das amostras foi monitorada a 260 nm e 280 nm. A quantidade de RNA total obtido calculado seguindo a relação: 1 OD = 40 µg/ml de RNA total (Sambrook e Russell, 2001).

3.2.2 Análise eletroforética de RNAs totais

A integridade das amostras de RNA total foi analisada através de eletroforese em gel de agarose, para tanto, géis de agarose 0,8 % foram preparados pela mistura de 0,4 g de agarose (Sigma) com 50 mL de tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM e água - DEPC), adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As amostras de RNA total foram preparadas misturando-se 10 µg de RNA a tampão de amostra (glicerol 7,5%, TAE 1,5x e azul de bromofenol 0,0037% qsp 10ul e aplicadas no gel. A eletroforese transcorreu a 80v por 1h.

3.2.3 Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Para a transcrição reversa, utilizamos o kit *ThermoScript RT-PCR System* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante, como segue: foram aliquotadas 5 µg de cada amostra de RNA total e adicionados a elas 1 µL do iniciador OligodT₂₀ (50 µM), 2 µL de dNTPs (0,4 mM) e água ultra-pura (Thermo Fisher Scientific) suficiente para 12 µL. Após 5 minutos a 65 °C para a desnaturação do RNA foram acrescentados a cada amostra: 4 µL de tampão 5X cDNA Synthesis

Buffer (1X), 1 µL de 0,1 M de DTT (ditiotretitol), 1 µL de inibidor de RNase comercial (RNaseOUT 40 U/µl) e 1 µL de ThermoScript RT (15 u/µL). As amostras foram então submetidas à transcrição reversa por 1 hora a 60°C, seguidos de incubação por 5 minutos a 85 °C em termociclador.

Na síntese da 2ª fita de cDNA, utilizamos o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific). As reações foram montadas com 15,2 µL de água; 2 µL do tampão específico para a enzima Platinum Taq 10X; 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,4 µL de dNTPs 10 mM, 0,4 µL dos iniciadores 5' (*primers* desenhados); 0,8 µl de cDNA e 0,16 µl da enzima por reação em um volume final de 20 µl. As amplificações foram realizadas segundo o programa abaixo:

Programa da PCR

94 °C – 3 min – desnaturação inicial	} 40 ciclos
94 °C – 1 min - desnaturação	
60 °C – 1 min - anelamento dos primers	
72 °C – 1 min – polimerização	
72 °C – 10 min – extensão	

Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Personal.

Para utilização nos experimentos de qRT-PCR antes da transcrição reversa o RNA total (5µg) foi tratado com DNase I (1U) (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o fabricante, para eliminação de qualquer resquício de DNA genômico nas amostras.

3.3 Clonagem do cDNA da β -actina e do gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH) de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) para utilização como controles internos em reações de qRT-PCR

Os iniciadores utilizados são os descritos por Cutri e Dornellas (2012) (Quadro 1). Após extração do RNA total de folhas de maracujá e checagem da viabilidade do mesmo, foi realizada uma RT-PCR. Os fragmentos resultantes foram, ligados ao vetor TOPO TA *Cloning Vector* (Thermo Fisher Scientific), segundo as instruções do fabricante. A reação resultante foi incubada por 5 min a 23 °C. Em seguida, mantida em gelo até o momento de utilização, para a transformação das

bactérias *E. coli*, cepa DH5 α T1 providas no *kit*. Para a transformação bacteriana foram utilizados 2 μ L da reação de clonagem adicionada as células competentes de *E.coli* DH5 α *One Shot* (Thermo Fisher Scientific) previamente descongeladas. Após incubação por 30 min a 25 °C, as células foram submetidas a choque térmico sendo mantidas a 42 °C por 30s. Em seguida, colocadas em gelo e adicionados 250 μ L de meio SOC (2 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM de glicose). As bactérias permaneceram incubando por 1 h a 37 °C 200 rpm. Então, 100 μ L da mistura (células–vetor-meio SOC) foram distribuídas em placas de petri, contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani) (Sambrook e Russel, 2001) sólido suplementado com 50 μ g.mL⁻¹ de ampicilina, mais 40 μ L de X-gal (5–bromo–4-cloro–3-indolil β -D-galactopiranosídeo) (40 mg.mL⁻¹) e 40 μ L de IPTG (Isopropil β -D-thiogalactopiranosídeo) 100 mM. As placas ficaram a 37°C por 16 h para aparecimento das colônias. A identificação das colônias recombinantes foi realizada a partir da análise de resistência ao antibiótico e funcionalidade do gene repórter LacZ, onde as bactérias transformadas resistentes a ampicilina produzem colônias azuis (carregam somente o vetor) e brancas (colônias com o vetor recombinante mais o fragmento de interesse). As colônias brancas obtidas foram repicadas em meio LB líquido (acrescido de 50 μ g.mL⁻¹ de ampicilina) e incubadas por 16 h a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm. O DNA plasmidial das colônias repicadas foi isolado com a utilização do *kit Purelink Quick Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Para liberação do fragmento ligado ao vetor pCR 2.1 –TOPO, foi realizada digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI*. A reação foi preparada adicionando-se 10 μ L (500 ng) dos vetores (pCR 2.1 –TOPO contendo os fragmentos de interesse) isolados, 2 μ L de tampão 10 x buffer H, 1 μ L da enzima *EcoRI* (15 U.mL⁻¹) e água ultra-pura até 20 μ L de reação. A mistura fica a 37 °C por 3h em termociclador. Após esse intervalo, as amostras foram analisadas por fracionamento em gel de agarose 1 %. O sequenciamento dos clones foi realizado no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, situado na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. No processo foi utilizado o *kit* de sequenciamento *ABI Prism Dye Terminator* (Perkin Elmer) seguindo a metodologia do fabricante e o sequenciador automático ABI Model 370 (Perkin Elmer).

3.4 Desenho dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real

Para o desenho dos iniciadores para os genes (*PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD* e *PfE*) foram utilizadas as sequências descritas por Domingues (2013). Tais sequências nucleotídicas foram alinhadas usando-se o software *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) e buscou-se que o alvo amplificado quando traduzido, possuísse a sequência *Kunitz signature motif*, sem sobreposição. Após a escolha do intervalo a ser amplificado, as sequências foram submetidas ao software *Oligo Calc* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) para determinação dos iniciadores. O iniciador *Pf5* (sequência consenso), foi desenhado a partir de uma região comum aos genes *PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD* e *PfE*. A sequência do gene para o iniciador Cys1 foi cedida pela professora Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira (Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas - Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). O gene LOX foi desenhado a partir do gene clonado por Jardim, *et al.* (2010), já o AOS a partir do gene clonado por Siqueira-Júnior, *et al.* (2008). A síntese foi feita pela Thermo Fisher Scientific, na escala de 25 nmol sem modificações 5' ou 3' (Quadro 1).

Iniciador	Tamanho final dos fragmentos	Sequências (senso e antisenso)	Fonte
GADPH	96	PfGADPHF GAC ATT CCA ACA TAC GTT GTT GGA G PfGADPHR GAG TGG TGC AAG AAG CAT TGC	Domingues (neste trabalho)
B-actina	100	PfACTF CTT TAT GCC AGT GGC CGT ACA ACT GG PfACTR GAT ACT TCC GAT ACG GGA GGG TGT A	Domingues (neste trabalho)
AOS	99	PfAOSF GTC TGT CCT TGT AAA TGC TGG GTT PfAOSR AAT TTT TTT TTT TGT AAA TAG ACC	Siqueira-Júnior et al., 2008
Cys1	96	PfCys1F GAG GAG CTT GCT CGA TTT GCT GTG PfCys1R GCC TGA TAC CAC CTG TTG CCT TGC	Cedida pela Dra Maria Lúcia Carneiro Vieira - USP
LOX	161	PfLOXF TCT ACG CCT GGG GTT ACT G PfLOXR TGC CTT TTG GTT TTG ATG GAC	Jardim et al., 2010.
PfA	63	PfAF GTA GTG TGA TTT CTA TAT CGC PfAR TCA TAA GTT GGT GGA TCC CTT AG	Domingues (2013)
PfB	97	PfBF GGA TCC ACC AAC TTA TGT ATC PfBR GAG ATG AAT GTT ATT TAA AAG	Domingues (2013)
PfC	104	PfCF GAT CCA CCA ACT TAT GAA TCC G PfCR GAT TCA GAC GAA TAG GGT TTT TAT T	Domingues (2013)
PfD	101	PfDF CTT TGG TAT CCC TAT AGA ATA AC PfDR CGA AAC AGA GTT TTA TAA TTT GAT AGC	Domingues (2013)
PfE	99	PfEF GTA TCC CTA TAG AAT AAC ATA TAT G PfER GTA TTA ATA ATA TTG TAA TAA ATT	Domingues (2013)
Pf5 (consenso)	100	Pf5F CGC CCA GTT ATA AGA GCA TTT GGT G Pf5R CAT GAT CAA CCT CAG GTC TGA GTT TC	-

Quadro 1: Iniciadores desenhados para utilização nos experimentos de PCR em tempo real.

3.5 Análise de qRT-PCR para inibidores de protease do tipo Kunitz de maracujá

O RNA total de folhas de maracujá foi obtido como descrito no item 3.2.1. A transcrição reversa e obtenção de cDNA como no item 3.2.3. Todos os iniciadores utilizados foram submetidos a PCR como descrito em 3.2.3.

A análise da eficiência dos iniciadores foi realizada utilizando-se a tabela REST (*Relative Expression Software Tool*) de Pfaffl e *et al.* (2002). Após a normalização dos iniciadores, prosseguimos para as reações de qRT-PCR, que foram realizadas utilizando-se o *kit Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante em termociclador *StepONEplus Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems), em colaboração do professor Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios (CBB-LBT-UENF). As condições de amplificação foram de acordo com Munhoz e *et al.* (2015), como segue: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 5 s e 60 °C por 1 min. As curvas de dissociação foram obtidas após os ciclos. As reações foram realizadas com 3 triplicatas biológicas e em 3 triplicatas técnicas para cada gene. Os dados obtidos foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Para estimarmos a significância das mudanças utilizamos o t-test (P-value < 0,05).

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem e sequenciamento do cDNA para β -actina e GADPH de maracujá

O RNA total extraído de folhas de maracujá foi retro-transcrito com transcriptase reversa utilizando-se o kit *ThermoScript RT-PCR System* (Thermo Fisher Scientific), conforme descrito na metodologia. Na Figura 6A está apresentado o padrão eletroforético do RNA total obtido. Pode-se observar que o padrão correspondente ao RNA ribossomal (Setas vermelhas) encontra-se íntegro.

O DNA complementar (cDNA) sintetizado foi utilizado para a amplificação das sequências para β -actina e GADPH utilizando-se os iniciadores obtidos tendo como base o trabalho de Cutri e Dornellas (2012).

Em um gel de agarose 1% (m/v) foram aplicados os produtos resultantes das amplificações dos referidos genes. Na figura 6B, estão representados os resultados da amplificação dos genes β -actina e GADPH, a seta azul indica uma banda de 658pb correspondente ao gene para β -actina e a seta verde indica uma banda de 643pb correspondente ao gene para GADPH. Foi utilizado o marcador molecular (Thermo Scientific) que vai de 100 pb a 5000 pb. Após verificação da amplificação, os fragmentos que apresentaram os tamanhos esperados 643 pb e 658 pb, correspondentes aos genes β -actina e GADPH, respectivamente, foram excisados do gel com o auxílio de um bisturi e purificados, utilizando-se o kit *GeneJet Gel Extraction* (Fermentas), então ligados ao vetor pCR 2.1-TOPO. Vetores contendo as sequências foram utilizados para transformação de bactérias *E. coli*, cepa DH5 α T1 providas no kit TOPO TA *Cloning Vector* (Thermo Fisher Scientific) e na seleção de clones positivos. As colônias positivas para o evento de clonagem (colônias brancas) tiveram o seu DNA plasmidial purificado e digerido com a endonuclease de restrição *EcoRI* e analisados em gel de agarose 1% (m/v). Como resultado podemos observar na Figura 6C indicado pela seta laranja o fragmento referente ao gene GAPDH e na Figura 6D pela seta amarela o fragmento referente ao gene β -actina, liberados do vetor após tratamento com a endonuclease *EcoRI*.

Os fragmentos foram enviados ao Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, na Fundação Oswaldo Cruz onde foram sequenciados em colaboração com a professora Dra. Ana Carolina Paulo Vicente.

As sequências obtidas foram submetidas ao banco do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com o auxílio da ferramenta *blastn* (disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome acesso em 9 de fevereiro de 2018). Quando submetida, a sequência para β -actina apresentou 92% de identidade com uma β -actina de *Populus euphratica* (número de acesso XM_011034907.1). Já quando observamos o gene GADPH, obtivemos 86% de identidade com o gene GADPH de *Hevea brasiliensis* (número de acesso XM_021790931.1).

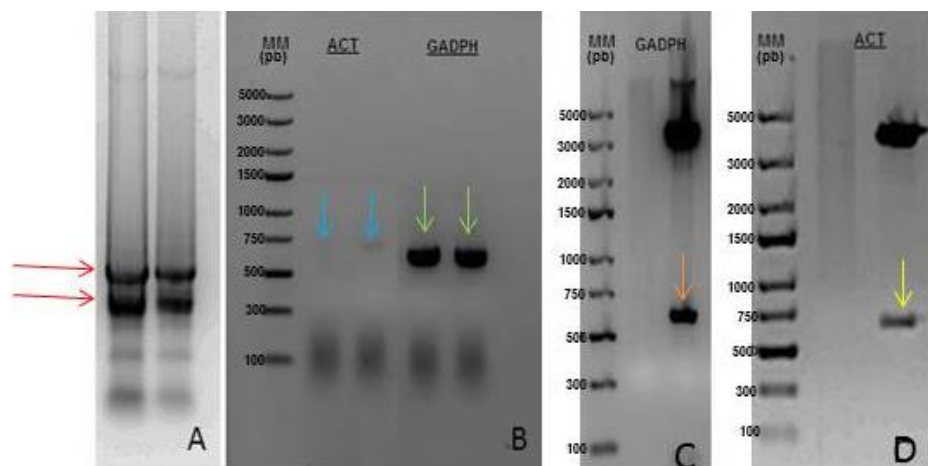


Figura 6: Etapas para a clonagem dos genes para β -actina e GADPH de maracujá. (A) RNA total extraído de folhas de maracujá. **(B)** Teste dos iniciadores para a amplificação dos genes para a β -actina e GADPH. **(C e D)** Clones obtidos que foram posteriormente sequenciados utilizando-se o sequenciador ABI Model 370 (Perkin Elmer), no Instituto Oswaldo Cruz. **MM:** marcador molecular, **ACT:** β -actina, **GADPH:** gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.

4.2 Padronização das condições de amplificação dos genes (*PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD*, *PfE*, *Pf5*, *Cys1*, *LOX*, *AOS*, *GADPH* e β -actina) para posterior análise por qRT-PCR

Em trabalhos realizados em nossa equipe de pesquisa, Domingues, D.P. (2013), clonou os genes *PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD* e *PfE* relacionados a síntese de inibidores de protease serínica do tipo Kunitz em maracujá. Com base nos dados de Domingues, iniciadores foram desenhados, para cada um dos 5 genes, para, posterior, utilização em reações de PCR em tempo real, no intuito de se estudar a expressão dos mesmos em resposta à indução por 12h com metil jasmonato.

Os iniciadores para os genes (*PfA*, *PfB*, *PfC*, *PfD*, *PfE* e *Pf5*) desenhados a partir dos dados de Domingues (2013), assim como os genes *LOX*, *AOS*, *Cys1*, *GADPH* e β -actina (descritos no quadro 1, item 3.4) foram utilizados para a padronização das condições de amplificação de seus referidos genes. Foram utilizadas as temperaturas de 55°C e 60°C e as seguintes concentrações de $MgCl_2$ (1,5mM; 2,5mM; 3,5mM e 4,5mM). Na figura 7, observamos os genes nas condições de 55°C e 60°C de temperatura e 1,5 mM $MgCl_2$.

Após estes testes prosseguimos para as reações de PCR em tempo real utilizando a temperatura de 60°C e 1,5 mM $MgCl_2$ (concentração presente no kit *Power SYBR Green PCR Master Mix*).

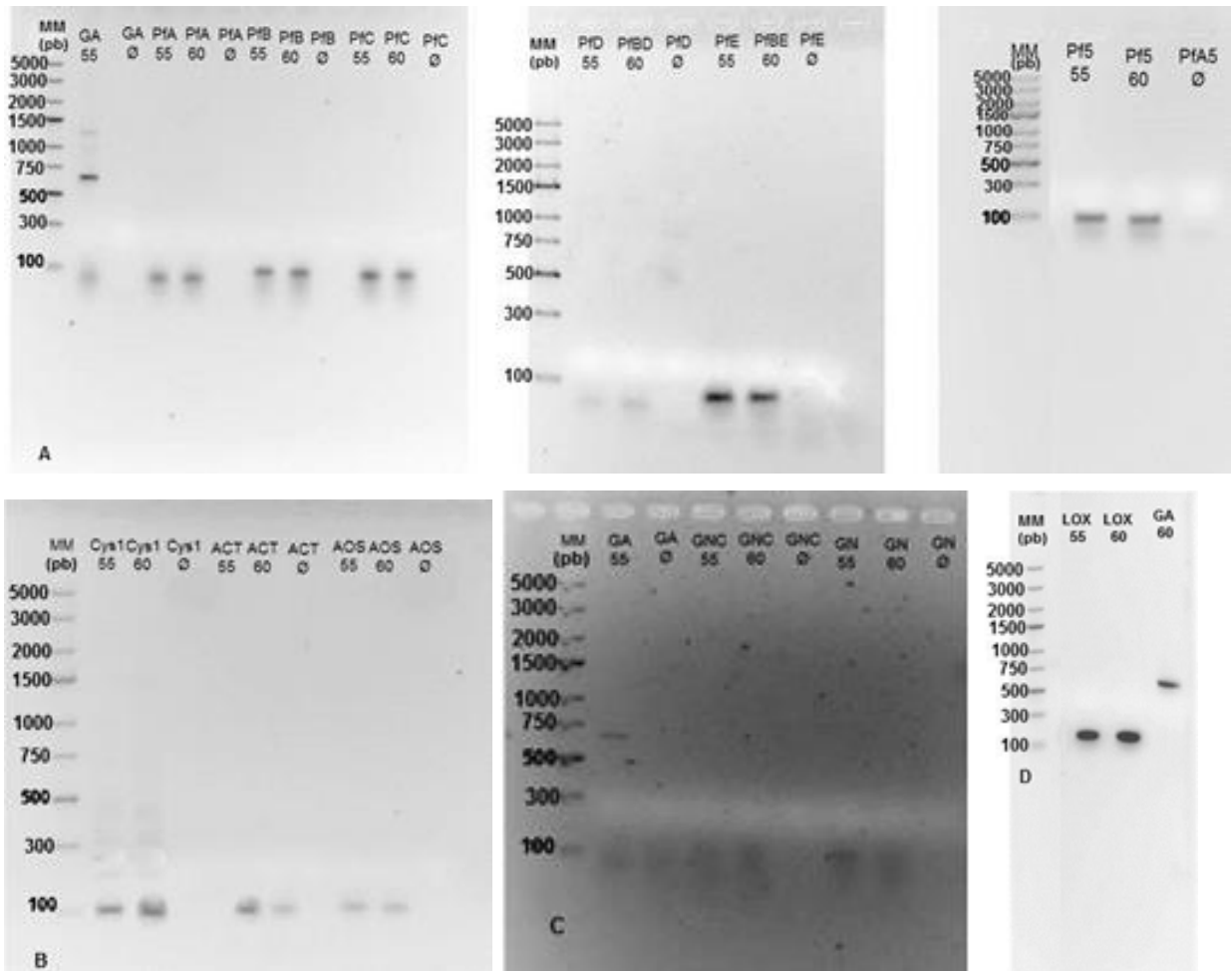


Figura 7: Amplificações dos genes utilizados nas reações de qRT-PCR nas condições de 55°C e 60°C. (A) Clones PfA, PfB, PfC, PfD, PfE e Pf5. (B) Cistatina (Cys1), β -actina (ACT) e aleno óxido sintase (AOS). (C) GADPH. GA: GADPH com 658 pb. GNC: gene com 100 pb após correção de um nucleotídeo no iniciador. GN: gene com 100 pb após construção de novo iniciador. (D) LOX: gene da lipoxigenase. MM: marcador molecular. 55 e 60: temperaturas utilizadas. Ø: amplificação realizada com ausência de cDNA na reação e a 60°C.

4.3 Análise da expressão gênica de 3 cDNAs de inibidores de protease serínica do tipo Kunitz

Para padronização nas reações de PCR em tempo real, iniciamos verificando a eficiência de amplificação dos iniciadores utilizados. Para isto, utilizamos o cDNA das amostras nas condições testadas (controle e MeJA) nas seguintes concentrações: 25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng e 400 ng (foram feitas triplicatas experimentais). Utilizamos como controle positivo o gene para 13-lipoxigenase (LOX). Utilizamos também o gene Cys (cistatina), que normalmente é induzido em resposta ao ataque de patógenos. Os candidatos a genes de referência também foram testados, utilizamos o GADPH e a β -actina. através desta análise verificamos que os iniciadores possuíam eficiências entre 98% e 109% na concentração de 100 ng de cDNA. A partir disto, todas as reações foram realizadas utilizando-se esta concentração. O iniciador relativo ao gene de referência para β -actina apresentou uma eficiência de 70% e não foi utilizado nos ensaios subsequentes. Os iniciadores AOS, PfB e PfE não foram determinados. Após a normalização o iniciador relativo ao gene de referência para β -actina apresentou uma eficiência de 70% e não foi utilizado nos ensaios. Os iniciadores AOS, PfB e PfE não foram determinados. O perfil de expressão dos genes foi conduzido com o GADPH, como gene de referência. O gene LOX se acumulou de forma expressiva com 12h de tratamento. Enquanto para os genes que levam a síntese de inibidores de protease serínica do tipo Kunitz, observamos que PfA e PfD tiveram sua expressão reduzida após o tratamento, já o gene PfC dobrou sua expressão em relação ao controle. Quando observamos o *pool* Pf5 não houve diferença estatística entre as plantas controle e as plantas induzidas neste período de 12h. Já o gene Cys1 foi expresso três vezes mais do que o observado em plantas que não foram tratadas.

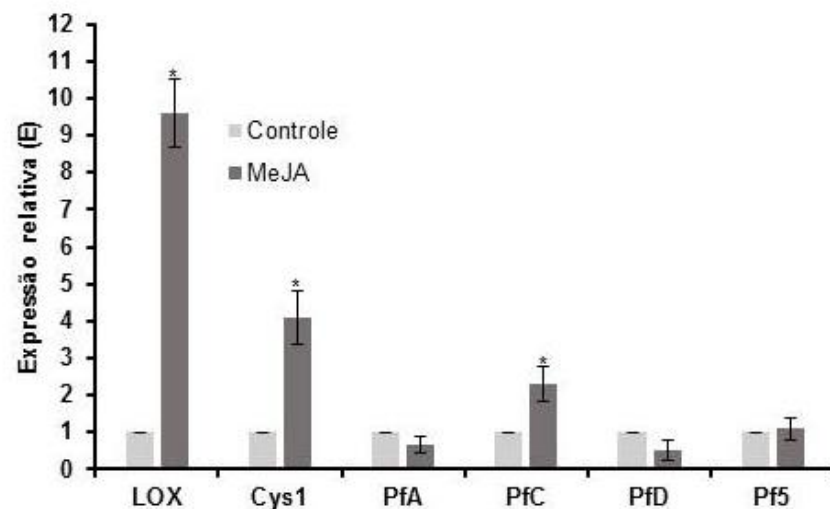


Figura 8: Quantificação da expressão relativa dos genes LOX, Cys1, PfA, PfC, PfD e do *pool* Pf5 em folhas de maracujá tratadas com metil jasmonato durante 12h. $n=3$ replicatas biológicas usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os símbolos (*) indicam as diferenças significativas de acordo com *t-test* ($P<0,05$). O gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH) foi utilizado como normalizador.

5. DISCUSSÃO

Uma das formas das plantas responderem a agressões de predadores é ativando uma cascata de sinalização que leva a produção do ácido jasmônico. Esse fitohormônio, assim como seus derivados, é um forte indutor da expressão de genes, que codificam proteínas com função defensiva (Vasyukova e colaboradores, 2011).

Ferimentos por insetos mastigadores ou danos mecânicos resultam no acúmulo localizado e sistêmico de altos níveis de inibidores de proteases em folhas de diversas plantas (Farmer e colaboradores, 1992). Possíveis utilidades para inibidores naturais de enzimas proteolíticas têm sido vistos em biotecnologia vegetal, entre as áreas potenciais de uso dos inibidores estão à produção de plantas transgênicas para aumento da resistência a pragas. Em uma das abordagens os inibidores servirão para impedir a degradação da proteína por proteases do inseto (Mosolov e Valueva, 2008).

Botelho-Júnior e colaboradores (2008) e Pereira e colaboradores (2011), isolaram e sequenciaram IPs presentes em folhas submetidas a tratamento com MeJA, ferimento mecânico e herbivoria, adicionalmente, eles isolaram IPs de expressão constitutiva, presentes durante o desenvolvimento floral e de flores em antese, respectivamente. Já em 2014, Botelho-Júnior e colaboradores verificaram o acúmulo

de 21 isoformas de inibidores de protease serínica do tipo Kunitz em folhas de maracujá após tratamento com MeJA a partir de sete inibidores purificados e caracterizados, assim como, o recrutamento de dois deles contra papaína, o que demonstra que essas proteínas estão co-evoluindo para levarem a planta a se defender contra as ameaças encontradas. Segundo Ma e colaboradores (2011), a presença de famílias de inibidores de proteinases multigênicas poderia fornecer as plantas uma grande vantagem adaptativa, permitindo regulação diferencial de cada membro da família de genes em resposta a diferentes estímulos exógenos.

Inibidores de proteases serínica do tipo Kunitz já foram reportados em plantas com importância econômica como batata (Suh e colaboradores, 1999), grão-de-bico (Srinivasan e colaboradores, 2005), feijão (Wang e Rao, 2010) e cacau (Silva e Figueira, 2005).

A seleção de genes codificadores para IPs serínicos do tipo Kunitz em maracujazeiro poderá ser útil em programas que visam o melhoramento genético do maracujazeiro.

Na análise por PCR em tempo real (figura 8), observamos que o gene LOX se acumula de forma expressiva com 12h de tratamento, este gene está diretamente ligado a síntese de metil jasmonato. Em 2010, Jardim e colaboradores verificaram o acúmulo de transcritos para lipoxigenase em resposta ao ataque por *Agraulis vanillae vanillae* (inseto especialista) e *Spodoptera frugiperda* (inseto generalista), assim como pela indução por MeJA, com maior concentração de transcritos em 12h. Já Munhoz e colaboradores (2015), verificaram que este gene foi altamente expresso em plantas de maracujá inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* neste trabalho também foi demonstrado que o gene Cys1 teve acréscimo na sua expressão de 2,2 vezes em 5 dias pós inoculação e de 1,5 vezes, nove dias após inoculação.

Através da indução com vapores de metil jasmonato, mimetizamos um possível ataque por herbívoros na planta e com este tratamento observamos que o gene Cys1 foi expresso três vezes mais do que o observado em plantas que não foram tratadas. Verificamos assim que em maracujá este gene é responsivo a MeJA. Assim como já foi descrito em folhas de amora tratadas com vapores de MeJA durante 12h, o acréscimo na expressão de dois genes (*MaCPI-1* e *MaCPI-6*) para inibidores de

protease cisteínica (Liang *et al.*, 2015), sendo que classicamente os inibidores cisteínicos são ativados em resposta a proteases intestinais de insetos herbívoros.

Para os genes que levam à síntese de inibidores de protease serínica do tipo Kunitz, observamos que PfA e PfD tiveram sua expressão reduzida após indução com vapores de MeJA durante 12h, enquanto o gene PfC dobrou sua expressão em relação ao controle. Chan e colaboradores em 2017 reportaram que o gene *CIKTI*, isolado de *Curcuma longa* foi expresso em todas as partes da planta quando submetida a vapores de metil jasmonatos durante 24h, porém sua maior expressão foi observada no caule da planta. Neste trabalho não foi feita a análise do acúmulo em folhas. Quando observamos o *pool* (Pf5) observamos que este não apresentou mudança em comparação ao controle, sendo que o esperado era um acúmulo maior de transcritos, já que utilizamos um iniciador que contemplaria todos os genes utilizados (PfA, PfB, PfC, PfD e PfE). Cutri e Dornelas (2012) descreveram dados relacionados ao PASSIOMA (biblioteca de ESTs de maracujá), onde a maioria dos transcritos representados eram proteínas relacionadas a estresse. A superexpressão dos genes PfA, PfB, PfC, PfD e PfE individualmente, pode facilitar a análise de suas propriedades bioquímicas para futuras aplicações biotecnológicas. Assim como, nossos estudos podem colaborar para o entendimento dos mecanismos de defesa do maracujazeiro, induzidos via jasmonatos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os iniciadores (PfA, PfB, PfC, PfD, PfE, GADPH e β -actina) desenhados a partir dos genes clonados foram otimizados para reações de qRT-PCR.
- ✓ Os genes estudados foram diferencialmente expressos em folhas de maracujá, em resposta ao tratamento com metil jasmonato durante 12h.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhondzadeh, S; Naghavi, H. R.; Vazirian, M.; Shayeganpour, A.; Rashidi, H.; Khani, M. (2001). Passion flower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 26: 363-367

Avanci, N. C.; Luche, D. D.; Goldman, G. H.; Goldman, M. H. S. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research*, 9: 484-505

Bernacci, L. C.; Meletti, L. M. M.; Soares-Scott, M. D. (2003). Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 355-356

Bode, W.; Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 204: 433-451

Boiça - Júnior, A. L.; Angelini, M. R.; De Oliveira, J. C. (2008). Aspectos biológicos de *Dione Juno Juno* (cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) em genótipos de maracujazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 101-105

Botelho-Júnior, S.; Siqueira-Júnior, C. L.; Jardim, B. C.; Machado, O. L. T.; Neves-Ferreira, A. G. C.; Perales, Jacinto, T. (2008). Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding and herbivory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9404–9409

Botelho-Júnior S.; Machado, O. L. T.; Fernandes, K. V. S.; Lemos, F. J. A.; Perdizio, V. A.; Oliveira, A. E. A.; Monteiro, L. R.; Filho, M. L.; Jacinto, T. (2014) Defense response in non-genomic model species: methyl jasmonate exposure reveals the passion fruit leaves' ability to assemble a cocktail of functionally diversified Kunitz-type trypsin inhibitors and recruit two of them against papain. *Planta*, 240:345-56

Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 183-205

Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515–1539

Carlini, E. A.; Rodrigues, R.; Mendes, F. R.; Tabach, R.; Gianfratti, B. (2006). Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 690-695

Cavichioli, J. C.; Ruggiero, C.; Volpe, C. A. (2008). Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 649-656

Cham, S.; Bakar, A. N.; Mahmood, M.; Ho, C.; Dzaki, N. M.; Shaharuddin, N. A. (2017). Identification and expression profiling of a novel Kunitz trypsin inhibitor (KTI) gene from turmeric, *Curcuma longa*, by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). *Acta Physiologiae Plantarum*, 39:1-12

Chehab, E. W; Perea, J. V.; Theg, S.; Dehesh, K. (2007). Oxylipin pathway in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 43-51

Chung, H. S.; Cooke, T. F.; DePew, C. L.; Patel, L. C.; Ogawa, N.; Kobayashi, Y.; Howe, G. A. (2010). Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *The Plant Journal*, 63: 613–622

Câmara Muqui. Disponível em: <[http:// www.camaramuqui.es.gov.br/](http://www.camaramuqui.es.gov.br/)> Acesso em: 21 de fevereiro de 2012

Chojnacka, M.; Szewinska, J.; Mielecki, M.; Nykiel, M.; Imai, R.; Wiesław Bielawski, W.; Orzechowski, S. (2015). A triticale water-deficit-inducible phytocystatin inhibits endogenous cysteine proteinases in vitro. *Journal of Plant Physiology*, 174: 161–165

Christeller, J. T. (2005). Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 272: 5710–5722

Chye, M. L.; Sin, S. F.; Xu, Z. F.; Yeung, E. C. (2006). Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions. *In Vitro Cellular Development Biology—Plant*, 42: 100–108

ClustalW. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>> Acesso em: 18 de janeiro de 2018

Creelman, R. A.; Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of Jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 355–381

Cutri L.; Dornelas M. C. (2012). PASSIOMA: exploring expressed sequence tags during flower development in *Passiflora* spp. *Comparative and Functional Genomics*, 2012:1–11

Das, A.; Lee, S.; Hyun, T. K.; Kim, S.; Kim, J. (2013). Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnology Reports*, 7: 9–26

Dhawan, K.; Kumar, S.; Sharma, A. (2001). Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia*, 72: 922-926

Dhawan, K.; Sharma, A. (2003). Restoration of chronic- Δ^9 -THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn. *British Journal of Pharmacology*, 138: 117–120

Dhawan K.; Dhawan S.; Sharma A. (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:1–23

Dicke, M.; Poecke, R. M. P. V.; Jetske, G. B. (2003). Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic and Applied Ecology*, 4: 2-42

Domingues, D. P. Clonagem molecular de inibidores de proteases do tipo Kunitz envolvidos no mecanismo de defesa do maracujazeiro. 2013. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes (Rio de Janeiro)

Ee, K.; Zhao, J.; Rehman, A.; Agboola, A. (2009). Purification and characterization of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Benthams seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7022–7029

Escobar, L. K. (1988). A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76: 877-885

Espírito-Santo, A. P.; Lagazzo, A.; Sousa, A. L. O. P.; Perego, P.; Converti, A.; Oliveira, M. N. (2013). Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Research International*, 50: 224–231

EMATER-RIO. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.agricultura.rj.gov.br/>> Acesso em: 17 de janeiro de 2018

Farmer E. E.; Ryan C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87: 7713–7716

Farmer, E. E.; Johnson, R. R.; Ryan, C. A. (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by Methyl Jasmonate and Jasmonic Acid. *Plant Physiology*, 98: 995–1002

Ferreira, F. M.; Neves, L. G.; Bruckner, C. H.; Viana, A. P.; Cruz, C. D.; Barelli, M. A. A. (2010). Formação de supercaracteres para seleção de famílias de maracujazeiro amarelo. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32: 247-254

Fonseca, S; Chico, J. M; Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 539–547

Flora Beija-Flor. Disponível em: <<http://www.florabeijaflor.com.br>> Acesso em: 21 de fevereiro de 2012

Frost, C. J; Mescher, C. M; Carlson, J. E; Moraes, C. M. (2008). Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology*, 146: 818–824

Geyter, N.; Gholami, A.; Goormachtig, S.; Goossens, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17: 349–359

Gfeller, A.; Dubugnon, L.; Liechti, R.; Farmer, E. E. (2010). Jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling*, 3: 1–6

Gubb, D.; Sanz-Parra, A.; Barcena, L.; Troxler, L.; Fullaondo, A. (2010). Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Biochimie*, 92: 1749–1759

Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 315–319

Heil, M.; Bueno, J. C. S. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 104: 5467-5472

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acesso em: 15 de janeiro de 2018

Iriti, M.; Faoro, F. (2009). Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and Ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 3371-3399

Jardim, B. C.; Perdízio, V. A.; Berbert-Molina, M. A.; Rodrigues, D. C.; Botelho-Júnior, S.; Vicente, A. C. P.; Hansen, E.; Otsuki, K.; Ürményi, T. P.; Jacinto, T. (2010). Herbivore response in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) plants: induction of lipoxygenase activity in leaf tissue in response to generalist and specialist insect attack. *Protein & Peptide Letters*, 17: 480–484

Kallenbach, M.; Alagna, F.; Baldwin, I. T.; Bonaventure, G. (2010). *Nicotiana attenuata* SIPK, WIPK, NPR1, and fatty acid-amino acid conjugates participate in the induction of jasmonic acid biosynthesis by affecting early enzymatic steps in the pathway. *Plant Physiology*, 152: 96–106

Kang, Z.; Jiang, J. H.; Wang, D.; Liu, K.; Du, L. F. (2009). Kunitz-type trypsin inhibitor with high stability from *Spinacia oleracea* L. seeds. *Biochemistry (Moscow)*, 74: 102–109

Koiwa, H.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2: 379-384

Kombrink, E. (2012). Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta*, 236: 1351–1366

Krowarsch, D.; Cierpicki, T.; Jelen, F.; Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 2427–2444

Lam, J.; Pwee, K.; Sun, W. Q.; Chua, Y.; Wang, X. (1999). Enzyme-stabilizing activity of seed trypsin inhibitors during desiccation. *Plant Science*, 142:209–218

Laskowski, M.; Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review Biochemistry*, 49: 593–626

Léon, J. Rojo, E. Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52:1-9

Lingaraju M. H.; Gowda L. R. (2008). A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 850–855

Llandres, A. L.; Rodríguez-Gironés, M. A.; Dirzo, R. (2010). Plant stages with biotic, indirect defences are more palatable and suffer less herbivory than their undefended counterparts. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 536–543

Malerbo-Souza, D. T.; Nogueira-Couto, R. H.; Toledo, V. A. A. (2002). Insetos associados às flores de diferentes espécies de maracujá (*Passiflora spp.*). *Acta Scientiarum*, 24: 1269-1274

Meletti, L. M. M. (2011). Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume Especial: 83-091

Mello, M. O; Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14:71-81

MEROPS—The Peptidase Database. Disponível em <<http://merops.sanger.ac.uk/inhibitors>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2018

Mithofer, A.; Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 431–50

Morant, A. V.; Jorgensen, K.; Jorgensen, C.; Paquette, S. M.; Sánchez-Pérez, R.; Moller B. L. ; Bak, S. (2008). β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, 69: 1795–1813

Mosolov, V. V.; Grigor'eva, L. I.; Valueva, T. A. (2001). Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37: 115–123

Mosolov V. V.; Valueva T. A. (2008). Proteinase Inhibitors in Plant Biotechnology: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 233–240

Mosolov, V. V.; Valueva, T. A. (2011). Inhibitors of proteolytic enzymes under abiotic stresses in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 453–459

Munhoz, C.; Santos, A.; Arenhart, A.; Santini, L.; Monteiro-Vitorello, B.; Vieira, C. (2015). Analysis of plant gene expression during passion fruit – *Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. *Annals of Applied Biology*, 167:135-155.

Murzin, A. G.; Leske, A. M.; Chothia, C. (1992). β -Trefoil Fold: patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. *Journal of Molecular Biology*, 223: 531 – 543

Oliva, M. L. V.; Silva, M. C.C.; Sallai, R. C.; Brito, M. V.; Sampaio, M. U. (2010). A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*, 92: 1667–1673

Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30:9-36

Patil, D. N.; Chaudhary, A.; Sharma A. K.; Tomar S.; Kumar, P. (2012). Structural basis for dual inhibitory role of tamarind Kunitz inhibitor (TKI) against factor Xa and trypsin. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 279: 4547–4564

Peixoto, M. (2005). Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético. EMBRAPA Cerrados, 647p.

Pereira, K. R. B.; Botelho-Júnior, S.; Domingues, D. P.; Machado, O. L. T.; Oliveira, A. E. A.; Fernandes, K. V. S.; Madureira, H. C.; Pereira, T. N. S.; Jacinto, T (2011). Passion fruit flowers: Kunitz trypsin inhibitors and cystatin differentially accumulate in developing buds and floral tissues. *Phytochemistry*, 72: 1955–1961

Pires, A. A.; Monnerat, P. H.; Pinho, L. G. R.; Zampirolli, P. Dom; Rosa, R. C. C.; Muniz, R. A. (2009). Efeito da adubação alternativa sobre os componentes de produção do maracujazeiro-amarelo. *Acta Scientiarum Agronomy*, 31: 655-660

Ponciano, N. J.; Souza, P. M.; Golynski, A. (2006). Avaliação econômica da produção de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) na região norte do estado do Rio de Janeiro. *Revista Economia e Desenvolvimento*, 18:17-32

Queiroz, M. S. R; Janebro, D. I. ; Cunha, M. A. L.; Medeiros, J. S.; Sabaa-Srur, A. U.; Diniz, M. F. F.; Santos, S. C. (2012). Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis f. flavicarpa deg.*) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Journal*, 11:89-96

Radhika, V.; Kost, C.; Boland, W.; Heil, M. (2010). The role of jasmonates in floral nectar secretion. *PLoS ONE*, 5: 1–6

Rangel, M.; Machado, L. T. O.; Cunha, M. E.; Jacinto, T. (2002) Accumulation of chloroplast-targeted lipoygenase in passion fruit in response to methyl jasmonate. *Phytochemistry*, 60: 619-625

Renko, M.; Sabotic, J. ; Turk, D. (2012). β -trefoil inhibitors—from the work of Kunitz onward. *Biological Chemistry*, 393: 1043-1054

Rocha, D. (2004). Produtor de maracujá. 2. Ed. Fortaleza: Ministério da Ciência e Tecnologia, 48 p.

Rodriguez-Saona, C. R.; Musser, R. O.; Vogel, H.; Hum-Musser, S. M.; Thaler, J. S. (2010). Molecular, biochemical, and organismal analyses of tomato plants simultaneously attacked by herbivores from two feeding guilds. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 1043–1057

Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 28: 425–449

Sambrook, J. E.; Russel, D. W. (2001). In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento. Disponível em: <http://www.rj.gov.br/web/seapec/exibeconteudo?article-id=2217392> acesso em 10 de janeiro de 2018

Silva, C. R. S.; Figueira, A. (2005) Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Systematics and Evolution*. 250: 93–104

Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 459-464

Siqueira-Júnior, C. L.; Jardim, B. C.; Ümériyi, T. P.; Vicente, A. C. P.; Hansen, E.; Otsuki, E. K.; Cunha, M.; Madureira, H. C.; Carvalho, D. R.; Jacinto, T. (2008). Wound response in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) plants: gene characterization of a novel chloroplast-targeted allene oxide synthase upregulated by mechanical injury and methyl jasmonate. *Plant Cell Reports*, 27: 387–397

Smigocki, A. C.; Ivic-Haymes, S.; Li, H.; Savic, J. (2013). Pest protection conferred by a *Beta vulgaris* serine proteinase inhibitor gene. *PLOS ONE*, 8: 1–12

Souza, V.C.; Lorenzi, H. (2008). Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II. 2a ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 704p.

Srinivasan, A.; Giri, A. P.; Harsulkar, A. M.; Gatehouse, J. A.; Gupta, V. S. (2005) A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. *Plant Molecular Biology*. 57: 359–374

Suh, S.; Moon, Y.; Hannapel, D. J. (1999). Posttranslational processing of the Kunitz-type potato proteinase inhibitor. *Journal of Plant Physiology*. 154: 498-502

Tremacoldi, C. R.; Pascholati, S. F. (2004). Inibidor de tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 135-140

Vasyukova, N. I.; Chalenko, G. I.; Gerasimova, N. G.; Ozeretskoykaya, O. L. (2011). Wound repair in plant tissues. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 229–233

Wang, S. Rao, P. (2010). A leguminous trypsin-chymotrypsin inhibitor Limenin with antifungal activity from *Phaseolus limensis*. *European Food Research and Technology*. 231: 331–338

Wasternack, C.; Maucher, H.; Hause, B.; Feussner, I.; Ziegler, J. (2000) Allene oxide synthase of barley (*Hordeum vulgare* cv. *Salome*): tissue specific regulation in seed development. *The Plant Journal*, 21: 199-213

Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on synthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100: 681-697

Wasternack, C.; Xie, D. (2010). The genuine ligand of a jasmonic acid receptor. *Plant signalling & Behavior*, 5: 337-340

Zeraik, M. L. ; Pereira, C. A. M. ; Zuin V. G. ; Yariwake, J. H. (2010). Maracujá: um alimento funcional? *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 459-471