

Análise da Indução de Lipoxigenase de Maracujá (*Passiflora  
edulis* SIMS) após o uso de Metil Jasmonato,  
Ferimento Mecânico e Herbivoria

**BRUNO DE CASTRO JARDIM**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
NOVEMBRO - 2009

Análise da indução de Lipoxigenase de maracujá (*Passiflora edulis* SIMS) após o uso de Metil Jasmonato, Ferimento Mecânico e Herbivoria

## **BRUNO DE CASTRO JARDIM**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Tânia Jacinto Freitas da Silva

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
NOVEMBRO - 2009

Análise da indução de Lipoxigenase de maracujá (*Passiflora edulis* SIMS) após o uso de Metil Jasmonato, Ferimento Mecânico e Herbivoria

**BRUNO DE CASTRO JARDIM**

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

Aprovada em 30 de novembro de 2009.

Comissão examinadora:

---

Profº.Dr. José Roberto da Silva – UFRJ

---

Profª. Drª.Beatriz Ferreira – UENF

---

Profº. Dr. Francisco José Alves Lemos - UENF

---

Profª. Dr. Tânia Jacinto Freitas da Silva – UENF  
Orientadora

Dedico este trabalho àquela que mais  
contribuiu para conclusão desta tese: minha  
filha **Alice**.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me conduzido até aqui.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Ana Francisca, e irmãos, Vitor e Patrícia, pelo apoio incondicional.

A Tânia Jacinto por ter acreditado no meu trabalho mesmo nos momentos mais difíceis.

A Vivian Vasques pelo companheirismo e dedicação.

A Dr<sup>a</sup> Beatriz Ferreira, pela revisão deste trabalho.

Aos professores Francisco José, José Roberto e Marília por aceitarem o convite de participação da banca examinadora.

Ao meu grande amigo Sylvio por esses anos de contribuição na bancada e nas confraternizações periódicas.

Aos meus amigos César, Sylvio, Viviane, Cristiane, Stafani, Keite, Dalvania, Amod Frutuoso por toda a ajuda nestes cinco anos.

Ao pessoal do Instituto de Biofísica da UFRJ. Professores Turán. Ao Dr. Deivid Carvalho pela ajuda nos experimentos de *northern blot*.

A Professora Ana Carolina, pela seqüência de DNA do fragmento da lipoxigenase.

Aos meus amigos do LBT.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Lagartas e Adulto de <i>Agraulis vanillae vanillae</i> .....	6
Figura 2: Lagarta e adulto de <i>Dione juno juno</i> .....	6
Figura 3: A rota do octadecanóide.....	11
Figura 4: A rota do Octadecanóide e suas principais oxilipinas.....	15
Figura 5: Síntese de ácido jasmônico.....	16
Figura 6: Esquema do plasmídeo.....	27
Figura 7: Avaliação da integridade do RNA total extraído do tecido foliar de plantas de maracujá .....	40
Figura 8: Análise do perfil de amplificação da LOX de maracujá .....	41
Figura 9: Padrão de digestão enzimática .....	42
Figura 10: Seqüência de nucleotídeos. ....	44
Figura 11 : Comparação das seqüências de aminoácidos deduzida.....	45
Figura 12: Análise do acúmulo dos transcritos de LOX.....	47
Figura 13: Perfil de expressão do gene em resposta a herbivoria.....	48
Figura 14: Atividade de LOX em resposta a herbivoria .....	51
Figura 15: Análise eletroforética por SDS-PAGE .....	52
Figura 16: Análise do soro imune e pré-imune .....	53
Figura 17: Espectro de massas .....	54
Figura 18: Análise do ácido jasmônico endógeno .....	55
Tabela 1: Dados referentes à produção brasileira de suco de maracujá.....	4
Tabela 2: Reagentes para clonagem do inserto .....	26

## RESUMO

O maracujá é uma importante cultura do Norte/Noroeste Fluminense. Mesmo com a expansão das áreas de plantio e produção, a cultura tem sérios problemas fitotécnicos e fitossanitários. Dentre estes, destacam-se os insetos como os principais causadores de perdas em produções agrícolas por alterem a capacidade fotossintética das plantas. Duas espécies são comumente encontradas: *Agraulis vanillae vanillae* e *Dionae juno juno*.

Entretanto as plantas respondem aos ataques de insetos herbívoros exibindo uma variedade de estratégias morfológicas e fisiológicas. As defesas diretas induzidas estão envolvidas na resposta sob o ataque de predadores. Assim os estímulos provocados pela lesão na planta levam a produção de moléculas sinalizadoras que ativam uma cascata de eventos culminando na ativação de genes de defesa e em seguida a síntese de proteínas defesa. Utilizando o tomate como planta modelo, uma via da transdução de sinalização da resposta de defesa vegetal foi proposta por Farmer e Ryan (1992).

Para o estudo do mecanismo de defesa em plantas de maracujá foi realizada, inicialmente, a síntese de um fragmento de cDNA de aproximadamente 700 pb, cuja seqüência deduzida de aminoácidos foi homóloga a diversas LOX vegetais. O fragmento foi utilizado como sonda marcada em experimentos de *Northern blot* evidenciando o acúmulo de RNAm de LOX em folhas de maracujá na resposta ao tratamento com metil jasmonato, ferimento mecânico e na resposta a herbívoros generalistas e especialistas (*Spodoptera frugiperda* e *Agraulis vanillae vanillae*).

Analisamos a atividade de LOX seguindo modelo de herbivoria causado pelas larvas dos insetos generalistas e especialistas após 24 e 48 horas. Observamos que a atividade de LOX aumenta consideravelmente quando submetidas as herbivorias, mesmo em folhas sistêmicas (folhas intactas de plantas submetidas à herbivoria) quando comparadas com o grupo controle. Os dados demonstram uma atividade análoga de LOX em resposta a ambos os insetos.

Além disso, também avaliamos a quantificação do ácido jasmônico produzido em plantas feridas, relacionando a quantidade de ácido jasmônico endógeno com o acúmulo de RNAm LOX em folhas de maracujá. Aliados aos

outros experimentos descritos, concluímos que a LOX de maracujá participa do processo de defesa vegetal culminando na síntese de ácido jasmônico através da via Octadecanóide.

## ABSTRACT

The passion fruit is an important crop in North and Northwest Fluminense. Even with the expansion of planted areas and production, the culture has serious problems phytotechnical and plant. Chief among these are the insects as the main cause of losses in agricultural production by changing the photosynthetic capacity of plants. Two species are commonly found: *Agraulis vanillae* and *Dionaea juncea*.

However plants respond to attack by herbivorous insects exhibiting a variety of morphological and physiological strategies. Induced direct defenses are involved in the response under attack from predators. Thus the stimuli caused by damage to the plant led to production of signaling molecules that activate a cascade of events culminating in the activation of defense genes and then protein synthesis defense. Using tomato as a model, a way of signaling transduction of plant defense response was proposed by Farmer and Ryan (1992).

To study the defense mechanism in passion fruit plants firstly we performed the synthesis of a cDNA fragment of approximately 700 bp, whose deduced amino acid sequence was homologous to several plant LOX. The fragment was used as labeled probe in Northern blot experiments showing the accumulation of LOX mRNA in leaves of passion in response to treatment with methyl jasmonate, mechanical wounding and in response to generalist and specialist herbivores (*Spodoptera frugiperda* and *Agraulis vanillae*).

We analyzed the activity of LOX following model of herbivory caused by larvae of the generalist and specialist insects after 24 and 48 hours. We observed that LOX activity increases considerably when subjected to herbivory, even in systemic leaves (leaves intact plants subjected to herbivory) when compared with the control group. The data show a similar activity of LOX in response to both insects.

In addition, we also evaluated the quantification of jasmonic acid produced in the wounded, relating the amount of endogenous jasmonic acid with the accumulation of LOX mRNA in leaves of passion fruit. Taken together our data lead us to conclude that the LOX of passion involved in the process of plant defense culminating in the synthesis of jasmonic acid via the Octadecanoid.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A agricultura é, indubitavelmente, um dos fatos marcantes do desenvolvimento da sociedade e da sobrevivência humana no planeta. Para alimentação correta de 6,5 bilhões de pessoas seria imprescindível o aumento da produção agrícola em cerca de 30% e para alimentar 10 bilhões de pessoas em 2050 a produção de alimentos deveria triplicar (Mazoyer, 2003), mas, segundo dados estatísticos, a ineficiência das técnicas agricultura não permitirá o alcance dessa meta até 2050 (Scolari, 2007). A competição interespecífica entre plantas invasoras e o predatismo por insetos são alguns maiores problemas que entravam o aumento da produtividade de plantas cultivadas (ANDEF, 2007). O crescimento da população desde o início deste século induziu uma maior produção de áreas agricultáveis e o monocultivo aliado com a abertura de novas fronteiras agrícolas em áreas tropicais e sub-tropicais fizeram com que modificações no ecossistema difundissem pragas na agricultura, gerando enormes prejuízos na economia de muitos países em desenvolvimento (Mazoyer, 2003).

O avanço do conhecimento do homem levou à obtenção de novos recursos e alternativas contra perdas agrícolas, como os agrotóxicos. Usado em larga escala no Brasil, esses químicos geram inúmeros prejuízos para o ambiente como intoxicações de solos, lençóis freáticos e de trabalhadores rurais (Ghini e Bettioli, 2000). Muitas técnicas têm sido propostas para minimizar o uso de agrotóxicos, uma delas é o melhoramento vegetal que permite seleção de cultivares resistentes às pragas efetivas nas culturas, como é o caso do fumo, trigo, arroz e outras espécies vegetais (Raven *et al.*, 2001). Com o advento da tecnologia do DNA recombinante abriu-se um grande espectro de manipulação genética tendo a biotecnologia como uma das alternativas viáveis ao combate de pragas agrícolas (Dicke *et al.*, 2004). A produção de plantas resistentes a insetos é uma das precedências dos programas de biotecnologia vegetal. Várias táticas já foram aplicadas, e um dos exemplos mais avaliados são as plantas transgênicas que produzem a toxina do *Bacillus thuringiensis*.

Diversas espécies vegetais, incluindo o milho, expressando a toxina *Bt* e resistentes a insetos já foram obtidas (van der Biezen, 2001).

## **1.2 O MARACUJÁ, COMO MODELO DE ESTUDO**

### **1.2.1 Características e importância econômica**

As espécies de maracujá pertencem à família Passifloraceae que é composta de doze gêneros, sendo o gênero *Passiflora*, o de maior expressividade, com cerca de 354 a 500 espécies americanas (Oliveira *et al.*, 2002; Souza e Meletti, 1997) No Brasil, o número de espécies é de 111 a 150, sendo a região Centro-Norte o maior centro de distribuição geográfica desse gênero (Faleiro *et al.*, 2005). Do gênero *Passiflora*, a espécie mais cultivada é a *Passiflora edulis* Sims que tem como nome vulgar, maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, seguida pela *Passiflora alata* ou maracujá-doce. Embora, com a coloração diferente, o maracujá roxo pertence à espécie *Passiflora edulis* Sims, e é muito cultivado na Austrália, África e sudeste asiático. Estima-se que, juntas, as espécies *P. edulis* Sims e *P. alata* ocupem mais de 90% da área cultivada com maracujá no mundo (Bernacci, 2008).

O maracujazeiro é uma planta arbustiva, trepadeira de crescimento contínuo e vigoroso podendo atingir até 10 metros de extensão. Após 160 dias da idade os ramos passam a ter um crescimento linear e as raízes desenvolvem-se rapidamente, entre 210 e 300 dias, após este período começa a floração e a formação de frutos (Liberato e Costa, 2001). Entra em floração com 4-5 meses de vida. A flor é hermafrodita com estigmas localizados acima das anteras (dificultando a polinização). O fruto tem formato variado (globoso, ovóide oblongo, piriforme), peso 100 a 160g, 9cm de diâmetro (cor variada - amarela roxa, esverdeada, avermelhada). Quando maduro, o fruto desprende-se e cai ao chão. A polpa do fruto, de cor amarela à laranja, envolve sementes, ovais, pretas, em número de aproximadamente 200 por fruto. O fruto murcha após seis dias de colhido. O suco do fruto tem acidez elevada (maracujá amarelo), acidez média (maracujá roxo) e acidez baixa (maracujá doce), e sabor e aroma agradáveis (MAARA, 2006).

Segundo o Instituto de Tecnologia de Alimentos do Estado de São Paulo, os principais segmentos de mercado para o suco concentrado e a polpa de maracujá são: 1) bebidas - principalmente os sucos de frutas, os néctares, os licores e a preparação de aperitivos e coquetéis de frutas tropicais; 2) laticínios - utilizados em iogurtes, misturas de leite e sorvetes; 3) confeitaria - utilizados em bolos, doces e recheios para bombons; 4) geléias e geleados; 5) alimentos enlatados - utilizados em salada de frutas tropicais, onde pedaços das frutas são colocados em xarope de maracujá; 6) fonte de niacina, vitamina A e C.

Além da polpa do fruto do maracujá, os outros possíveis subprodutos seriam a pectina obtida da casca e o óleo comestível obtido a partir da semente. Esses subprodutos, no entanto, não são extraídos em nível industrial, estando restritos a experimentos de laboratórios (Rizzi *et al.*, 1998).

Com uma área plantada de aproximadamente 46.000 hectares, o cultivo de maracujá está disperso por quase todo o território nacional o que representa cerca de 0,7% da área destinada à produção de lavouras permanentes no país (IBGE, 2008). O Brasil é apontado como o principal produtor mundial, tendo como maiores produtores os estados Bahia (23,6 milhões toneladas), seguida do Estado de São Paulo (18 milhões toneladas), Espírito Santo (6 milhões toneladas) (Tabela 1). Também vem avançando a produção dos Estados de Pernambuco (34 mil toneladas) e do Rio de Janeiro (31 mil toneladas) (Agrianual, 2008).

Segundo os dados disponíveis, a produção nacional de suco de maracujá evoluiu, no período 1993 - 2005, conforme a Tabela 1. Observa-se que no ano de 1995 ocorreu uma queda nas exportações de maracujá devido ao plano econômico vigente, o que não acarretou na diminuição da produção do fruto.

**Tabela 1:** Dados referentes à produção brasileira de suco de maracujá.

Ano	Produção	Tonelada	(%)	Tonelada	(%)
1993	36.692,8	33.048,3	90,1	3.644,5	9,9
1994	41.501,9	39.375,7	94,9	2.126,2	5,1
1995	67.240,0	66.992,0	99,6	248,0	0,4
1996	72.122,6	66.511,6	92,2	6.109,0	8,5
1997	79.335,0	73.163,0	92,2	6.172,0	7,8
2000	87.270,0	80.480,0	92,2	6.790,0	7,8
2005	95.995,0	88.528,0	92,2	7.467,0	7,8

### 1.2.2 Pragas e Doenças do Maracujazeiro

Mesmo com a expansão das áreas de plantio de maracujá, a cultura passa por sérios problemas fitotécnicos e fitossanitários. Dentre estes, destacam-se os artrópodes fitófagos, bactérias, fungos e vírus, que causam danos consideráveis ao maracujazeiro, reduzindo sua produção. De acordo com Fancelli em 1998, entre os insetos-praga do maracujazeiro, destacam-se as moscas-das-frutas, a broca-do-maracujazeiro, os pulgões, os percevejos, as lagartas desfolhadoras.

Os principais danos causados pelas moscas-das-frutas são decorrentes da oviposição em frutos ainda verdes, provocando o seu murchamento antes de atingirem a maturação. As larvas ao atacarem os frutos podem destruir totalmente sua polpa, inutilizando-os para o consumo (Souza-Filho *et al*; 2000). Os percevejos da espécie *Halhymenia bistris*, tanto as ninfas como os adultos,

sugam a seiva das plantas resultando na queda de botões florais e frutos novos. As larvas da broca do maracujazeiro (*Philonis passiflorae*) bloqueiam os ramos, provocando seu secamento e queda das folhas a partir do ponto atacado, que apresenta aspecto de engrossamento (MAARA, 2004).

Diversas espécies de lepidópteros se alimentam de folhas do maracujazeiro. O inseto na fase adulta coloca os ovos sob a folha, pecíolo, ou ramo do maracujazeiro. Os ovos darão origem às lagartas, que se alimentarão diretamente das folhas, desenvolvendo até a fase de pupa (crisálida), as quais dão origem aos adultos. Duas espécies são comumente encontradas: *Agraulis vanillae vanillae* e *Dionae juno juno* (Melletti et al., 1994).

A espécie *Agraulis vanillae vanillae* apresenta distribuição neotropical, ocorrendo desde o sul dos EUA, Índias Ocidentais até o norte da Argentina e Uruguai (Devries, 1987). Segundo Heppner (2004), são reconhecidas oito subespécies, sendo referidas por Michener (1942) para o Brasil: *Agraulis vanillae*, *A. vanillae maculosa* e *A. vanillae vanillae*. O adulto apresenta, na face dorsal das asas, cor laranja com manchas pretas, e na face ventral, laranja e marrom com manchas pretas e prateadas (Boiça Júnior, 1998). (Figura 1 B).

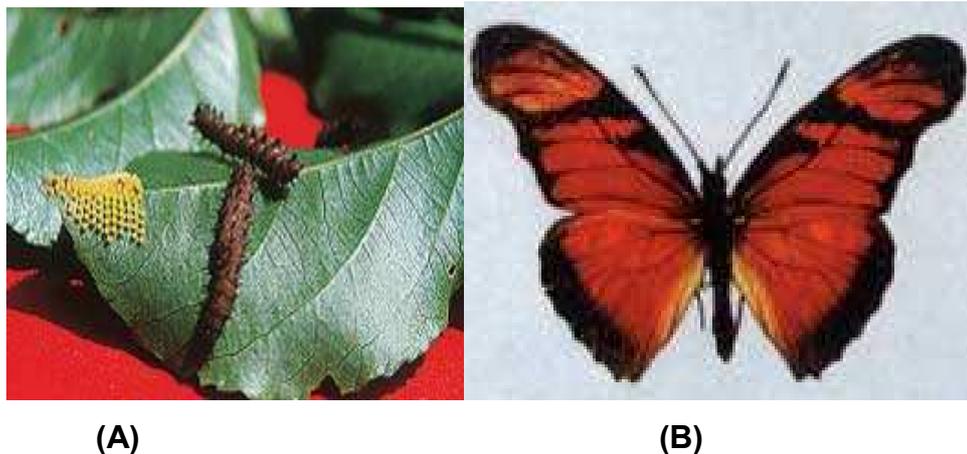
As formas adultas de *Dione juno juno* são borboletas com cerca de 60 mm de envergadura, apresentando as asas de coloração alaranjada e as margens externas com faixas pretas, a forma larval apresenta uma coloração pardo-escura; cabeça preta; corpo recoberto por espinhos, e vivem agregadas (Boiça Júnior, 1998) (Figura 2 A e B).

Essas duas espécies são consideradas pragas-chave para a cultura do maracujá, pois podem ocorrer todos os anos, causando severos danos às plantas. Durante os primeiros instares, as lagartas raspam a epiderme da folha, perfurando pequenos orifícios. Posteriormente, consomem as folhas sem demonstrar preferência por idade ou estágio de desenvolvimento. O ataque desses insetos caracteriza-se pela existência de folhas danificadas, com redução da área foliar, além da presença da lagarta em desenvolvimento (Boiça Júnior, 1998).

Os danos são mais sérios em plantas jovens ou naquelas com parte aérea pouco desenvolvida, ou quando as lagartas se encontram nos instares finais, pois nessa fase seu consumo de alimento é significativamente maior. São de grande importância na fase de formação da cultura, quando podem

causar mortalidade de plantas, devido à baixa capacidade de recuperação das mesmas. Ataques mais intensos de lagartas no maracujazeiro são verificados no período mais seco do ano (Cunha, *et al.*, 2004).

Além dos prejuízos causados pelo desfolhamento e conseqüente esgotamento das plantas, que se reflete na diminuição de sua capacidade de produção de frutos, registra-se ainda corte das brotações novas, danos às flores e raspagem dos ramos do maracujazeiro (Boiça Júnior, 1998).



**Figura 1:** Lagartas (A) e adulto (B) de *Agraulis vanillae vanillae* Fonte: Maracujá - Do plantio à colheita (5º Simpósio Sobre a Cultura do Maracujazeiro).



**Figura 2:** Lagarta (A) e adulto (B) de *Dione juno juno*. Fonte: Maracujá - Do plantio à colheita (5º Simpósio Sobre a Cultura do Maracujazeiro).

Diversas bactérias estão assinaladas como patogênicas ao maracujazeiro. De acordo com Bradbury (1986), esses agentes causais e seus principais sintomas são: *Agrobacterium tumefaciens*, incitando tumores; *Pseudomonas syringae*, ocasionando manchas foliares, e *Xanthomonas campestris*, provocando lesões foliares, além de morte da planta.

Embora várias espécies de nematóides já tenham sido associadas à cultura do maracujazeiro, somente *Meloidogyne spp.* e *Rotylenchulus reniformes* são relatados como causa de danos severos ao maracujazeiro. O *Meloidogyne* é considerado um dos mais importantes nematóides fitoparasitas, induz a formação de sítios de alimentação conhecidos por galhas, sendo uma permanente fonte de nutriente para o desenvolvimento e reprodução deste fitonematóide acarretando nanismo, amarelecimento generalizado, murcha, internódios curtos, frutos pequenos e queda de botões florais (Pio-Ribeiro e Mariano, 1997). A espécie *Rotylenchulus reniformes* não causa galhas, mas o sistema radicular fica impossibilitado de se aprofundar no solo causando severa limitação na produção de frutos e diminuição da longevidade da planta (Souza *et al.*, 2003).

A primeira virose para o maracujazeiro descrita no Brasil foi o “passionfruit woodiness fruit”, referido como endurecimento dos frutos. Esta virose tem sido considerada a mais grave. Maracujazeiros infectados pelo vírus VEFM (vírus do endurecimento dos frutos maduros) mostram sintomas generalizados de mosaico foliar, com intensidade variável, podendo vir acompanhados de manchas foliares, bolhas e rugosidades, culminando em deformação do limbo foliar. As plantas afetadas apresentam um crescimento retardado. Os frutos ficam deformados e menores do que as plantas saudáveis; a casca apresenta espessura irregular e consistência endurecida (Chagas, 1993). Desde então vários outros vírus foram descritos, alguns deles causando perdas significativas. Entre os vírus estão: vírus da pinta verde (causando lesões necróticas) (Colariccio *et al.*, 1995), vírus do enfezamento (causando deformações no fruto) (Batista *et al.*, 2001) vírus do mosaico (causando clorose) (Oliveira *et al.*, 1994) e fitoplasma do superbrotamento (causando clorose generalizada) (Barros, 1999).

As plantas de maracujá podem ser afetadas por várias doenças causadas por fungos. Dentre as doenças fúngicas que ocorrem na parte aérea,

inclui-se a antracnose e verrugose ou cladospirose (*Cladosporium herbarum*), como as mais comuns. Algumas dessas, sob condições favoráveis, podem se constituir em problema limitante à produção. A doença citada como mais severa é a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, esta doença incide em todos os órgãos da planta e, em folhas se caracteriza pelo aparecimento de manchas necróticas pardas, inicialmente pequenas e translúcidas, posteriormente maiores e com saliências negras. Em estágios mais avançados causam desagregação e rachaduras na área necrosada, as plantas afetadas apresentam intensa desfolhagem (Pio-Ribeiro e Mariano, 1997).

### **1.3 OS PRINCIPAIS MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL CONTRA INSETOS HERBÍVOROS**

Apesar das aparências, as plantas não aceitam de modo passivo as agressões que sofrem de vírus, bactérias, insetos e demais organismos ou de agentes abióticos como radiação, temperaturas extremas, poluição e outros. Para sobreviver, durante sua evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de resposta a danos e doenças, acionados assim que a agressão se inicia (Ananthakrishnan, 1999; Moffat, 2001).

Os insetos podem ser destacados como os principais causadores de perdas na produtividade agrícola, pois alteram a capacidade fotossintética das plantas. A diversidade dos insetos abrange em torno de 66% da vida animal e, aproximadamente, um terço de todas as espécies conhecidas (Thomazini e Thomazini, 2000). Possuem hábito herbívoro, ao menos na sua forma larvar, e desempenham um importante papel ecológico atuando como predadores, parasitas, polinizadores, fitófagos, entre outros (Edwards e Wratten, 1981).

As plantas exibem estratégias e modificações que reduzem as perdas fisiológicas, respondendo ao ataque dos insetos herbívoros através de duas estratégias principais: a defesa indireta e direta (Aimura *et al.*, 2005). A defesa indireta está relacionada à produção de compostos que atraem os inimigos naturais do inseto agressor (Degenhardt, 2009). Diferentemente, a defesa direta protege a planta do ataque dos insetos pela produção de barreiras físicas e químicas, que podem ser constitutivas, quando a planta expressa resistência

de forma contínua, sem depender da ação de herbívoros, e/ou induzidas, quando a resistência se expressa somente após a injúria ou derivado do crescimento vegetal (Fadini *et al.*, 2004).

As barreiras físicas (morfológicas) podem ocorrer por espessamento da epiderme e presença de cutícula lipídica, atuando negativamente sobre o inseto. A presença de lipídios na cutícula e o espessamento da epiderme por lignina impedem a fixação, deposição de ovos e a perfuração dos tecidos por insetos (Lucas *et al.*, 2000). Os apêndices epidérmicos também atuam como barreiras físicas, afetando a oviposição, liberando substâncias (terpenos, gomas e taninos) ou apresentando tricomas que dificultam a locomoção sobre a superfície foliar (Peeters, 2002). Enquanto isso, as barreiras químicas estão relacionadas à produção de metabólitos secundários. Estes metabólitos são classificados quanto à estrutura química: nitrogenados (alcalóides, aminoácidos não-protéicos e glicosídeos cianogênicos), terpenóides (óleos essenciais, triterpenos, saponinas e glicosídeos cardioativos) e fenólicos (ligninas, flavonóides e taninos) e reduzem a disponibilidade de proteínas para o herbívoro (Santos, 2004).

As defesas diretas induzidas estão envolvidas na resposta sob o ataque de predadores. Nesse modelo, os estímulos provocados pela lesão na planta levam a produção de moléculas sinalizadoras que ativam uma cascata de eventos culminando na ativação de genes de defesa e em seguida a síntese de proteínas de defesa. Entre as diferentes moléculas induzidas podemos citar as peroxidases, as polifenoloxidasas, as defensinas (Thomma *et al.*, 2002), as proteínas de transferência de lipídios (LTP) (Buhot *et al.*, 2004) e os inibidores de proteases (IPs) (Walker-Simmons e Ryan, 1984; Ananthakrishnan, 1999; Felton, 2006). Dentre os mecanismos de defesa vegetal induzida, a Rota do Octadecanóide merece destaque, pois além de ativar genes que codificam inibidores de proteases, é responsável pela produção de diversos metabólitos funcionais, denominados oxilipinas (Bleé, 2002).

#### **1.4 A VIA DO OCTADECANÓIDE**

Utilizando o tomate como planta modelo, uma via da transdução de sinalização da resposta de defesa vegetal foi proposta por Farmer e Ryan em

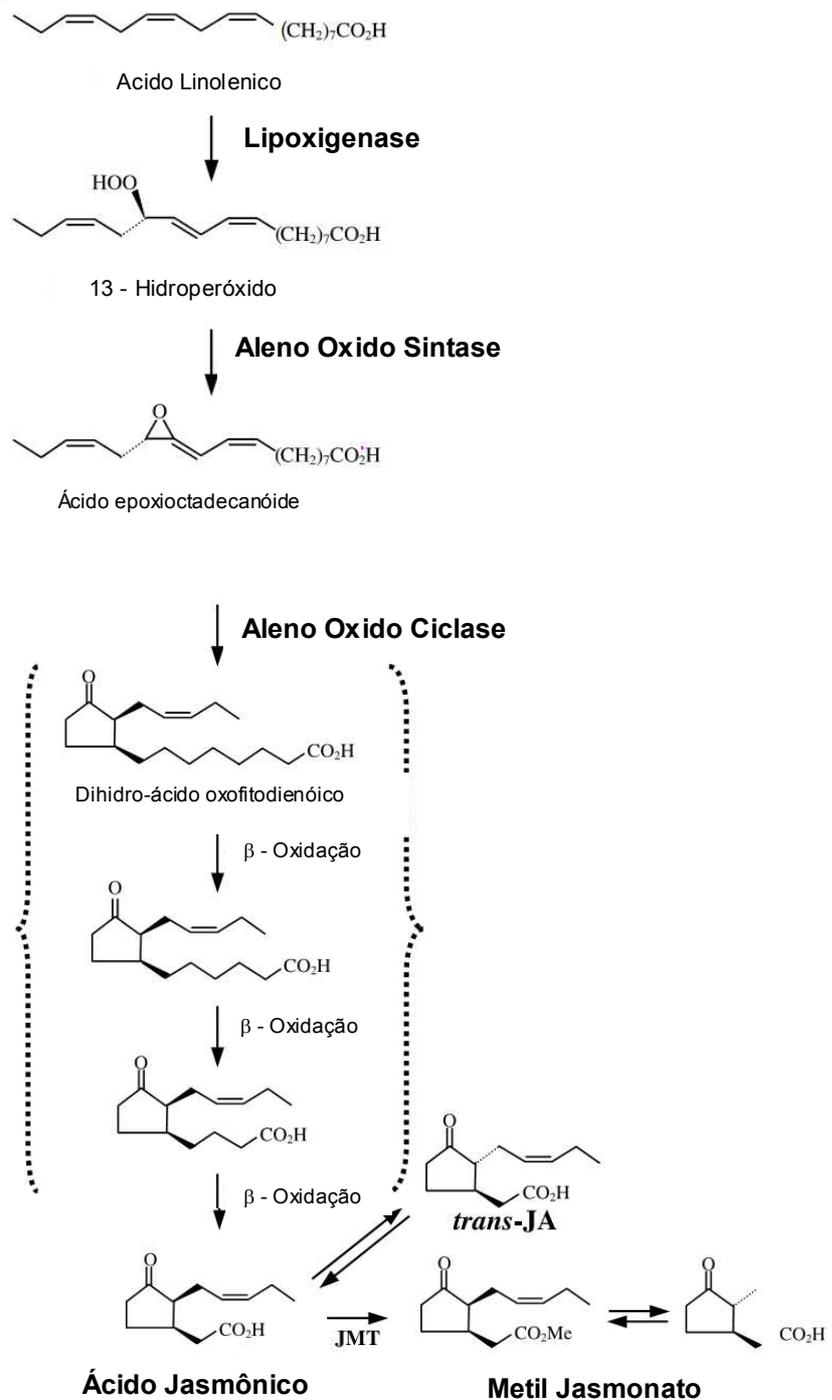
1992. Nesse modelo, quando o inseto ataca o tecido foliar ocorre à liberação de um sinal que induz a atividade de lipases, levando a liberação do ácido linolênico da membrana citoplasmática. Estes ácidos graxos livres alimentariam uma cascata metabólica levando a produção do ácido jasmônico. Então, o ácido jasmônico promoveria a ativação de genes para a síntese de inibidores de proteases. Esta via metabólica que apresenta compostos contendo 18 carbonos é chamada de Rota do Octadecanóide (Figura 3), cujo principal produto é o ácido jasmônico. As fosfolipases A<sub>2</sub> (PL A<sub>2</sub>) são as enzimas responsáveis por liberar o ácido linolênico de membranas celulares, especialmente as membranas de cloroplastos (McConn *et al.*, 1997; Ryu e Wang, 2006).

As moléculas sinalizadoras de ativação da lipase 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). Foram propostas várias moléculas sinalizadoras, incluindo fragmentos da parede celular vegetal (oligogalacturonídeos) (Ryan e Farmer, 1991), e de fungos (quitina) (Walker-Simmons e Ryan, 1984; Leon *et al.*, 2001); metil jasmonato (Farmer e Ryan, 1990; Ryan, 2000; Ryan *et al.*, 2002); ácido abiscísico (Peña-Cortes *et al.*, 1989) e sistemina (Pearce *et al.*, 1991).

A sistemina foi a primeira molécula sinalizadora descrita. A sistemina é um polipeptídeo de 18 aminoácidos (Pearce *et al.*, 1991) que possui grande mobilidade entre os tecidos vegetais induzindo defesa a outras regiões da planta. A funcionalidade da sistemina foi demonstrada por McGurl e colaboradores em 1992, quando verificam que plantas de tomates transformadas com o cDNA da pré-proteína prosistemina, no sentido contrário de sua orientação, sob o controle do promotor do vírus da couve-flor, perdiam a capacidade de gerar defesa contra o ataque de larvas de *Manduca sexta*, reduzindo a quantidade de inibidores de proteases I e II nas folhas. No mesmo trabalho a sistemina foi superexpressada em plantas transgênicas de tomate no qual se observou uma produção quatro vezes maior de inibidores de proteases I e II nas plantas controles. Os pesquisadores Scheer e Ryan em 1999, através de marcações de sistemina com I<sup>125</sup>, identificaram o receptor

plasmático para sistemina (SR160) que atua sinergeticamente com o metil jasmonato para amplificar o sinal de defesa.

A análise das funções do ácido jasmônico, seus intermediários e das enzimas responsáveis por sua síntese compreendem o principal foco de estudo utilizando a rota do octadecanóide, bem como a produção dos metabólicos intermediários, as oxilipinas.



**Figura 3:** A Rota do Octadecanóide. Demonstrando o principal produto: o ácido jasmônico (adaptado de Andreou e Feussner, 2009)

## 1.5 AS FITO-OXILIPINAS

Em vegetais a biossíntese das oxilipinas está ligada à resposta para diferentes estímulos causados por fatores abióticos ou por fatores bióticos (como insetos e patógenos) e são derivadas do ácido linoleico e do ácido linolênico que são os ácidos graxos poliinsaturados majoritários nas plantas (Blée, 1998). As oxilipinas são metabólitos produzidos durante a oxidação dos ácidos graxos insaturados quando dois ou quatro átomos de oxigênio são inseridos em sua estrutura. A catálise dessa reação é condicionada pela enzima lipoxigenase (LOX), durante a via do octadecanóide (Blée, 2002).

As fito-oxilipinas podem derivar da atividade do citocromo P450 dependente de oxigenase, da ciclo-oxigenase e da Via das Lipoxigenases. As fito-oxilipinas produzidas pelo citocromo P450 participam na formação de cutina e participa no processo de sinalização celular (Kahl *et al.*, 2000), enquanto a catalise da ciclo-oxigenase está envolvida na produção de  $\alpha$ -hidroxiperoxidase (Wellesen *et al.*, 2001). Contudo, o mecanismo de oxidação de ácidos graxos para a produção de fito-oxilipinas amplamente estabelecido é a Via da Lipoxigenases e suas ramificações (Figura 4). Através desses mecanismos as plantas promovem uma drástica mudança na composição dos derivados de ácidos graxos oxigenados, dependendo das ramificações utilizadas na via da lipoxigenases (Agrawal, *et al.* 2004)

A cascata de eventos enzimáticos inicia-se através da atividade da enzima lipoxigenase (LOX), catalisando a formação de hidroperóxido a partir de ácido linolênico (Stenzel *et al.*, 2003). Contudo os hidroperóxidos também são substratos para outros sistemas enzimáticos que transformam estas moléculas, altamente reativas, em uma série de fito-oxilipinas. A ação enzimática da aleno óxido sintase (AOS) lidera a formação do ácido jasmônico, molécula sinalizadora envolvida no processo de defesa e desenvolvimento (Song *et al.*, 1993). Alternativamente, o hidroperóxido pode ser clivado por uma hidroperóxido liase (HPL) formando hexanal e ácido 12-oxo-dodecenóico (Matsui *et al.*, 2000; Noordermeer *et al.*, 2001). Este último, é precursor da traumatina, um composto mitogênico que está envolvido na cicatrização de ferimentos, enquanto o hexanal (trans-2-hexanal) é um

importante constituinte volátil de frutos e folhas verdes, além de desempenhar papéis na defesa vegetal (Halitschke e Baldwin, 2005; Myung, *et al.*, 2006).

O divinil éster sintase (Itoh e Howe, 2001) pode converter o intermediário hidroperóxido em ácido eteroleico que está envolvido na resposta de defesa vegetal produzindo monômeros de cutina e fitoalexina, sendo este último classificado como pesticida natural (Blée, 1998). A fito-oxilipina conhecida com  $\alpha$ -Ketol (9-hidroxi-10-oxo-12,15-ácido decanóide) está diretamente envolvida na florescência de plantas de lentilhas (*Lemna* sp.) (Yokoyama *et al.*, 2000).

O acúmulo preferencial de compostos gerados pela Via das Lipoxigenases está diretamente ligada às reações bióticas e abióticas promovidas pelo ambiente. Compostos como o ácido jasmônico (AJ) são responsáveis pela ativação de genes de inibidores de protease, uma defesa direta contra insetos herbívoros (Feussner e Wasternack, 2002).

## 1.6 OS JASMONATOS

Farmer e Ryan (1992) analisaram vários intermediários octadecanóides da Via das Lipoxigenases. Essa análise revelou que octadecanóides bem como os jasmonatos poderiam estar envolvidos no complexo sinal que regula a expressão de genes de defesa em plantas. O modelo proposto na Figura 5 demonstra os passos chaves envolvendo a interação dos sinais extracelulares com os receptores da membrana plasmática, a ativação de lipases e por fim a síntese de ácido jasmônico e ativação gênica.

Nos vegetais, um dos sinais moleculares mais potentes para acionar a defesa é o ácido jasmônico (AJ), que é sintetizado a partir do ácido linolênico. Esta via tem sido proposta como uma via central de mecanismo de defesa em plantas (Wasternack *et al.*, 1998). O termo “jasmonatos” refere-se ao ácido jasmônico e seus derivados ativos como o metil jasmonato e conjugados de aminoácidos (como a valina, leucina e isoleucina) (Bate e Rothstein, 1998) e o próprio ácido jasmônico (Wasternack e Parthier, 1997). Estes compostos são distribuídos largamente em plantas e estão envolvidos em vários processos fisiológicos com efeitos variados (Creelman e Mullet, 1997), incluindo germinação de sementes (Matsui *et al.*, 1999), produção de polens viáveis (Ishiguro *et al.*, 2001), indução de VSP (proteína de reserva) em folhas de soja

(Anderson et al., 1989,) resposta contra estresses bióticos (Leone *et al.*, 2001), abióticos (Porta *et al.*, 1999) e crescimento de raízes de *Nicotiana attenuata* (Hummel *et al.*, 2009).

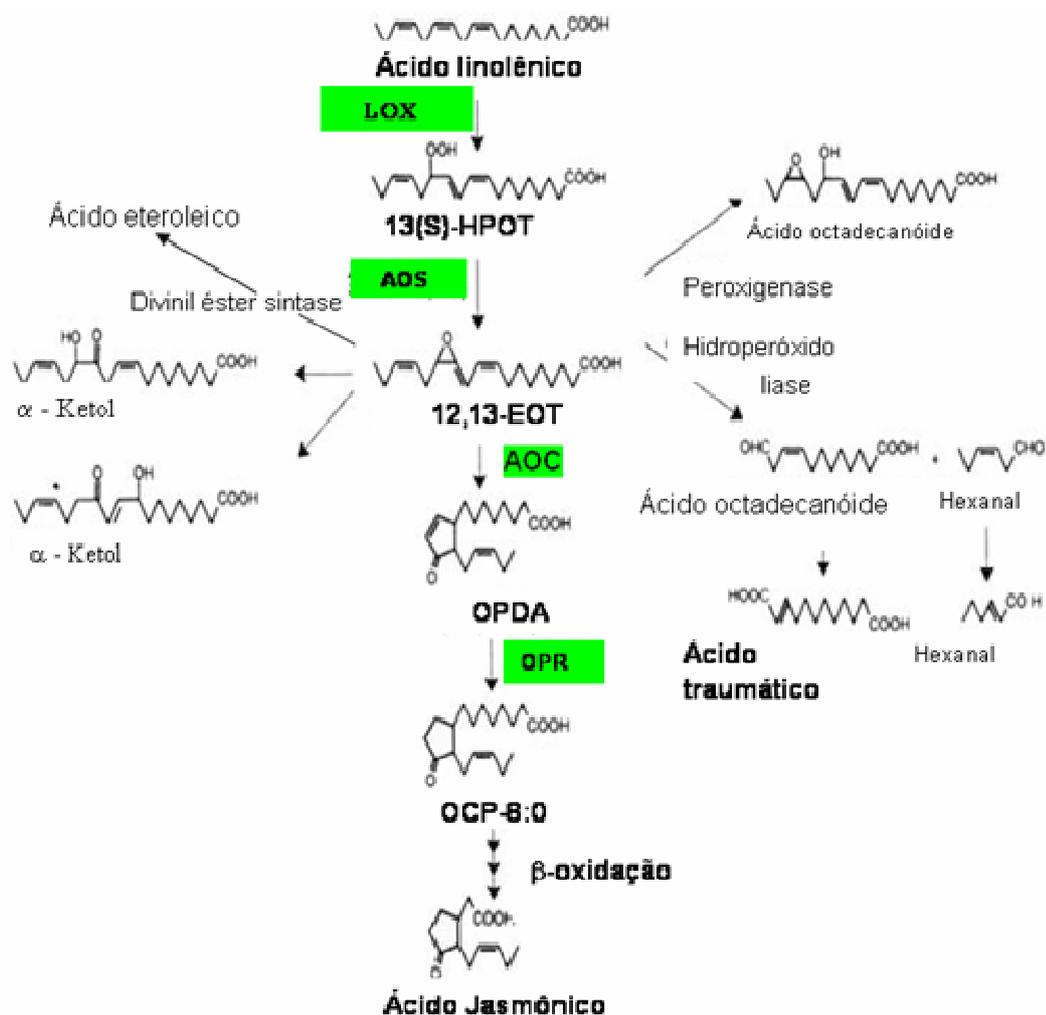
Uma função de defesa contra predadores tem sido atribuída ao ácido jasmônico desde a descoberta de que o metil jasmonato (MJ) induz a síntese de inibidores de proteinase em plantas de tomate (Farmer e Ryan 1990). Pesquisas com plantas modificadas geneticamente superexpressando a enzima ácido jasmônico metil transferase (JAMT), que converte ácido jasmônico em metil jasmonato, mostraram um aumento da síntese de metil jasmonato e de ácido jasmônico (Seo *et al.*, 2001). Nessas plantas foi observado um aumento na resistência sistêmica, levando a uma proposição de que o ácido jasmônico e o metil jasmonato também promovem a resposta de defesa sistêmica (Howe, 2004).

A biossíntese do ácido jasmônico foi descrita por Vick e Zimmerman em 1983, iniciando-se com uma enzima lipoxigenase catalisando a oxigenação do ácido linolênico, formando um hidroperóxido. Em seguida, o hidroperóxido formado é metabolizado por uma aleno óxido sintase. Subseqüentemente, o ácido 12-oxofitodienólico é formado pela atuação de uma aleno óxido ciclase. Finalmente uma redutase e três passos de  $\beta$ -oxidação formam o ácido jasmônico (Li *et al.*; 2005; Miersch e Wasternack, 2000). Esta seqüência de reações é parte da chamada Via da Lipoxigenase.

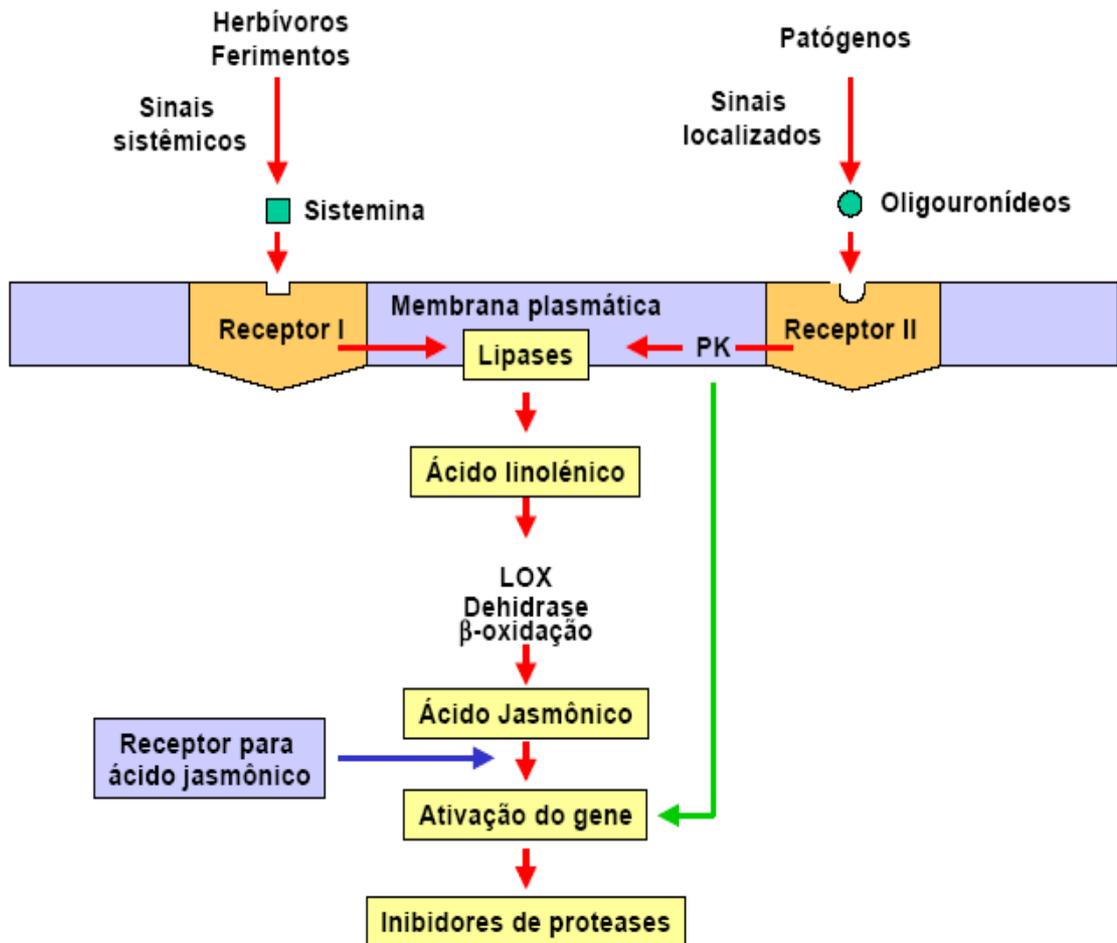
Vários genes já caracterizados podem ter sua expressão regulada pelo ácido jasmônico ou metil jasmonato. As proteínas codificadas por estes genes são chamadas de JIPs (*Jasmonate-Induced Proteins*) e são pleiotrópicos, atuando como indutores de defesa contra estresses bióticos ou ativando mecanismos fisiológicos (Pauwels *et al.*, 2009). Por exemplo, os genes JIPs em cevada levam a senescência, degradação da Rubisco (ribulosebifosfatocarboxilase) e outros constituintes do cloroplasto levando a morte celular (Reinbothe e Parthier, 1997); ácido jasmônico induz a síntese dos inibidores de proteases I e II de tomate (Farmer e Ryan, 1992); o citocromo P450 de soja (Suzuki *et al.*, 1996); lipoxigenase de *Arabidopsis thaliana* (Bell e Mulet, 1993) e de cevada (Feussner *et al.*, 1995) e as proteínas inativadoras de ribossomos (Nielsen e Boston, 2001).

O ácido jasmônico apresenta relação funcional com diversos fitohormônios, ativando processos fisiológicos importantes para o crescimento e defesa vegetal. A existência dessa interligação está demonstrada com ácido salicílico, etileno, ácido abscísico, auxina (Kazan e Manners, 2008) e giberelinas (Nemhauser *et al.*, 2006).

A diversidade de genes regulados positivamente pelos jasmonatos e as funções das proteínas que eles codificam sugerem que estes compostos podem atuar como moléculas sinalizadoras em vários processos fisiológicos (Wasternack e Parthier, 1997).



**Figura 4:** A Rota do Octadecanóide e suas principais oxilipinas (adaptado de Vick e Zimmermann, 1983). A cascata enzimática (em verde) culmina na produção de ácido jasmônico. LOX: lipoxigenase; e 13(S)-HPOT: ácido octadecanóide; AOS: aleno óxido sintase; EOT: ácido octadecatrienoico; AOC: aleno óxido ciclase; OPR: 12-oxo-ácido fitodienóico redutase; OPDA: ácido oxofitodienóico.



**Figura 5:** Síntese de ácido jasmônico e ativação de genes de defesa através da cascata enzimática iniciada por ligação de eliciadores em receptores de membrana (adaptado Farmer e Ryan, 1992).

## 1.7 LIPOXIGENASE

Uma das enzimas chave na via biossintética do ácido jasmônico é a lipoxigenase (LOX). Lipoxigenases são isoenzimas (E.C. 1.13.11.12) que catalisam a dioxigenação de ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno para formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando moléculas reativas (Farmer e Ryan, 1992). Em mamíferos, as lipoxigenases catalisam a dioxigenação de ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico, levando a produção de leucotrienos que estão envolvidos em reações inflamatórias, desenvolvimento celular e patogênese de várias doenças como osteoporose e arteriosclerose (Parker, 1987; Mei, *et al.*, 2008). Em vegetais o ácido araquidônico é pouco encontrado e os principais substratos para a lipoxigenase são o ácido linolênico e o ácido linoleico (Siewdon, 1991). Os produtos da via da lipoxigenase têm sido associados com várias funções como no desenvolvimento vegetal (Kolomiets *et al.*, 2001), ativação de estoques lipídicos em sementes (Feussner *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2005), crescimento vegetativo (Fischer *et al.*, 1999), amadurecimento de frutos (Griffithis *et al.*, 1999), defesa contra herbívoros (Creelman e Mullet, 1997), patógenos (Rancé *et al.*, 1998), reações de desintoxicação formando glutadiona S-transferase (GST) (Gaquerel *et al.*, 2007) e determinação sexual em milho (Acosta *et al.*, 2009).

A expressão do gene da lipoxigenase é regulada por diferentes fatores como jasmonatos (Agrawal *et al.*, 2004), ácido abscísico (Melan *et al.*, 1993), e também por diferentes formas de estresse, como ferida, deficiência de água (Porta *et al.*, 1999) ou ataque de patógenos e insetos herbívoros (Porta *et al.*, 2008). Além da localização citoplasmática da LOX (Porta e Sosa, 2002), é descrito o acúmulo em diversos compartimentos celulares tais como: no estroma de cloroplastos (Heitz *et al.*, 1997; Froehlich *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2002), vacúolos (Feussener *et al.*, 1995) e mitocôndrias (Brairot *et al.*, 1993). Contudo, pesquisas indicam que a LOX encontrada no cloroplasto está comprometido com o mecanismo de defesa de plantas em resposta a ferimentos e tratamento com metil jasmonato (Bell *et al.*, 1995; Feussner e Wasternack, 2002; Rangel *et al.*, 2002).

Múltiplas isoformas de lipoxigenases foram descritas em várias espécies vegetais. Em cevada, por exemplo, pelo menos três isoformas foram fortemente induzidas por jasmonatos (Wasternack *et al.*, 1998). Duas delas, uma com 100 kDa (LOX100) e outra com 92 kDa (LOX92), foram localizadas nos cloroplastos. Vários dos cDNAs de LOX isolados até o momento foram induzidos por jasmonatos, ferimento mecânico e ataque de patógenos, indicando o envolvimento das LOXs nos mecanismos de defesa contra predadores (Bell e Mullet 1991; Peng *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1996; Heitz *et al.*, 1997). As isoformas variam quanto ao substrato utilizado preferencialmente, parâmetros cinéticos e a posição específica da oxigenação do substrato. Os ácidos graxos insaturados com 18 carbonos, como o ácido linolênico ou o ácido linoléico são utilizados como substratos e podem ser formados 9- ou 13-hidroperóxidos, de acordo com a posição do carbono no qual é inserido o oxigênio. Dependendo desta especificidade posicional, as LOXs que inserem oxigênio molecular no átomo de carbono 9 ou 13 são classificadas como 9-LOX ou 13-LOX, respectivamente (Wasternack *et al.*, 1998), sendo este o primeiro passo da Via das Lipoxigenases.

O papel da atividade das 9-LOXs em plantas é pouco compreendido. É descrito na literatura que os 9-hidroperóxidos não são substratos para a AOS. Contudo quando os 9-hidroperóxidos são metabolizados pela HPL, ocorre a formação de aldeídos e oxiácidos com 9 carbonos (Creelman e Mullet, 1995; Andreou *et al.*, 2008). Diferentes funções estão sendo atribuídas as 9-LOX, como crescimento vegetativo em batatas (Kolomiets *et al.*, 2001), desenvolvimento de sementes em amendoeira (Santiago *et al.*, 2005), indução de defesa contra patógenos em tabaco e batata (Rancé *et al.*, 1998; Kolomiets *et al.*, 2000; Cacas *et al.*, 2008) desenvolvimento de raízes em *Arabidopsis* (Vellosillo *et. al.*, 2007)

Na Via das Lipoxigenase, a atividade de 13-LOX sobre o ácido linolênico leva à formação de 13-hidroperóxidos do ácido linolênico, os quais podem ser substratos tanto para AOS quanto para HPL. Quando o 13-hidroperóxido é metabolizado pela ação da hidroperóxido liase, a traumatina é formada (figura 4). Por outro lado, quando os 13-hidroperóxidos são metabolizados pela AOS seguida por uma redutase e três passos de  $\beta$ -oxidação, ocorre a síntese do ácido jasmônico (Figura 3). Deste modo, foi proposto, que a Rota do

Octadecanóide é muito importante para ativação dos genes de defesa vegetal contra o ataque de predadores (Farmer e Ryan, 1992).

Os hidroperóxidos produzidos pela atividade da lipoxigenase são os substratos para a ação subsequente de outras duas enzimas, a aleno óxido sintase (AOS) ou a hidroperóxido liase (HPL).

Os genes de lipoxigenases são agrupados em duas classificações de acordo com as estruturas das proteínas (Shibata *et al.*, 1994;). Os genes do tipo LOX1 foram isolados de plantas superiores e apresentam identidade de seqüência quando as seqüências de aminoácidos deduzidas são comparadas. A outra classificação, tipo LOX2, é determinado por um número pequeno de genes que codificam proteínas com baixo nível de conservação, e que apresentam uma seqüência N-terminal de direcionamento para o cloroplasto. As LOX tipo 2 são todas pertencentes a subfamília das 13-LOX (Feussener e Wasternack, 2002).

A indução da expressão do gene LOX por ferimento e jasmonatos foi descrita em diversas espécies vegetais. Em experimentos realizados por Bell e Mullet em 1993, plantas de *Arabidopsis* foram expostas aos vapores do metil jasmonato gerando a expressão do gene *AtLOX2* e *AtLOX1*, embora quando a planta é ferida nota-se somente a expressão do gene *AtLOX2*, tanto no local da injúria como em locais distantes do ferimento. O uso de plantas transgênicas tem sido decisivo para elucidar a via das lipoxigenases em diferentes processos fisiológicos. Assim, quando plantas transgênicas de *Arabidopsis* com o gene *AtLOX2* silenciado é ferida, observa-se a redução dos níveis de ácido jasmônico e dos inibidores de proteinases quando comparado com plantas de *Arabidopsis* com o gene *AtLOX2* ativo (Bell *et al.*, 1995).

Em plantas de tomate foi investigada a expressão da lipoxigenase durante a resposta de defesa vegetal (Heitz *et al.*, 1997). Neste trabalho foram isolados dois clones de cDNA que codificam lipoxigenases sendo denominados TomLOXC e TomLOXD. A análise da expressão destes genes demonstrou o aumento dos transcritos de TomLOXD após o ferimento mecânico, tratamento com metil jasmonato e sistemina. Os transcritos de TomLOXC foram somente detectados no processo de amadurecimento dos frutos.

Estudos desenvolvidos por Royo *et al.* (1999) demonstraram a presença de dois genes da lipoxigenase (H1 e H3) ativos em tecidos foliares de plantas

de batata. A análise da expressão desses genes demonstrou aumento dos transcritos após ferimento e o tratamento com metil jasmonato. Outra etapa decisiva para o desenvolvimento da pesquisa foi à produção de plantas transgênicas de batata com o gene H3 silenciado. Analisando se essas plantas transgênicas verificou-se uma diminuição do acúmulo de inibidores de proteases em resposta ao ferimento mecânico, além disso, os insetos alimentados com estas plantas tiveram um peso 30% maior do que os insetos alimentados com planta controles.

Na interação incompatível entre plantas de ervilhas e o nematóide *H. goettingiana*, foi observada (na raiz) uma indução da atividade da LOX, além de necrose causada pela resposta de hipersensibilidade. Em contraste, numa interação suscetível, observou-se uma menor atividade de LOX e ausência de necrose. Estes resultados sugerem que a LOX possui um papel na interação raiz-nematóide e nos mecanismos de defesa contra patógenos (Leone *et al.*, 2001).

Cheng e colaboradores (2006) clonaram e expressaram dois genes, *PdLOX1* e *PdLOX2*, do Álamo (*Populus deitoides*). Análises cromatográficas indicaram que estas duas lipoxigenases possuíam atividade 13-LOX (tipo 2) e estavam envolvidos em processos de estresses de ordem biótica e abiótica. Utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real, foram verificados altos níveis de expressões gênicas para tratamentos com metil jasmonato e ferimento mecânico.

Em uma importante pesquisa, plantas de tabaco foram geneticamente modificadas para expressar uma isoforma da lipoxigenase (LOX3) na orientação anti-sentido. A LOX3 foi primeira descrita por Royo *et al.* (1996) como responsivo ao tratamento com metil jasmonato e ao ferimento. A expressão desse transgene anti-sentido reduziu o acúmulo de ácido jasmônico, prejudicando a ativação de genes responsáveis pela resistência empreendida contra a herbivoria de insetos mastigadores. As baixas produções desses compostos resultaram numa redução da resistência ao herbívoro *Manduca sexta*. Contudo, a resistência da planta contra herbivoria foi restaurada após tratamento com metil jasmonato (Halitschke e Baldwin, 2005). O estudo de sinalização e resposta à ferida mecânica e patógenos também foi estudado em plantas de feijão, onde foi corroborado a hipótese de indução de LOX e seu

endereçamento para cloroplastos (Porta *et. al.*, 2008). Em conjunto esses resultados confirmam a importância da LOX na indução da rota do octadecanóide, uma via geradora de moléculas sinais ativadoras de genes envolvidos com a defesa vegetal.

A transdução da sinalização da resposta de defesa em plantas de maracujá foi alvo de estudos no nosso grupo de pesquisa. Os experimentos realizados demonstram que o ferimento mecânico e o tratamento com metil jasmonato provocam um aumento na atividade da LOX no tecido foliar. A LOX induzida possui uma massa molecular em torno de 90kDa e foi purificado até a homogeneidade. Estudos quanto à especificidade desta proteína, utilizando o ácido linoleico como substrato, demonstrou que a LOX converte o substrato exclusivamente em 13-hidroxiperóxido. Além disso, investigações a nível subcelular demonstraram que a LOX induzida pelo tratamento com metil jasmonato é direcionada para o cloroplasto. Estes resultados sugerem que a resposta ao ataque de insetos em plantas de maracujá pode ser mediada por um 13-LOX localizada no cloroplasto (Rangel *et al.*, 2002).

Sendo o maracujá uma das culturas frutíferas mais importantes da região norte/noroeste do estado do Rio de Janeiro e devido ao fato desta fruta ser de grande importância para a produção de vários produtos de interesse econômico torna-se imprescindível o estudo e a avaliação do funcionamento da lipoxigenase de plantas de maracujá

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar o papel da lipoxigenase na indução de resposta de defesa em plantas de maracujá contra o ataque de insetos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a expressão de LOX em resposta ao ferimento mecânico, tratamento com metil jasmonato e herbivoria via experimento de *Northen Blot*.
- Dosar do ácido jasmônico no tecido foliar induzido em resposta ao ferimento mecânico.
- Analisar a atividade da LOX *in vitro* em resposta à herbivoria.
- Produção de anticorpos policlonais anti-LOX para análise dos níveis de indução de LOX em plantas expostas à herbivoria, via experimento de imunodeteção em membrana.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 CULTIVO DAS PLANTAS DE MARACUJÁ**

Os frutos de maracujá amarelo foram obtidos no mercado local do município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. As sementes foram coletadas, secadas em temperatura ambiente e estocadas a 4°C. As sementes foram distribuídas em vermiculita e cultivadas em ambiente com temperatura e luminosidade controladas. Após aproximadamente três semanas, as plântulas foram replantadas em terra adubada comercial e retornadas as condições climáticas anteriores. Quando as plantas apresentaram quatro folhas expandidas foram então utilizadas nos experimentos.

#### **3.2 TRATAMENTO COM METIL JASMONATO E FERIMENTO MECÂNICO**

Para a exposição aos vapores de MJ, as plantas de maracujá intactas foram mantidas em recipientes de vidro, devidamente lacrados, com 1µL de MJ em algodão conforme metodologia descrita por Bolter (1993). Os recipientes com as plantas foram mantidos por períodos determinados sob iluminação controlada, como descrito no item 3.1 dessa seção. Para indução da resposta de defesa, a borda da folha expandida inferior foi ferida mecanicamente com uma pinça cirúrgica hemostática, simulando o ataque de insetos mastigadores.

#### **3.3 EXPOSIÇÃO DAS FOLHAS DE MARACUJÁ A HERBIVORIA**

Lagartas generalistas de lepidópteros *Spodoptera frugiperda* (2° estágio) foram adquiridas através da empresa Bug Brasil ([www.bugbrasil.com.br](http://www.bugbrasil.com.br)). As lagartas mais ativas foram confinadas com plantas de maracujá em potes telados com malha antiafídica.

A lagarta especialista da espécie *Agraulis vanillae vanillae* também foi utilizada para os experimentos. Ovos de insetos (depositados nas folhas) foram coletados no campo. As folhas contendo os ovos foram mantidas em potes telados até a eclosão das larvas, estas foram alimentadas com folhas frescas

de maracujá por um período de dois ou três dias antes da escolha das lagartas mais ativas para o experimento de herbivoria, de acordo com a metodologia descrita por Kahl e colaboradores em 2000. As folhas submetidas à herbivoria foram recolhidas nos tempos 24 e 48 horas após a exposição com as larvas para o experimento da atividade de LOX *in vitro* e para experimentos de *Northern blot*. O confinamento durou 12 horas, para ambas as lagartas.

### **3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO TECIDO FOLIAR**

Folhas de maracujá foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Para a extração do RNA total foi utilizado o reagente comercial Trizol (Gibco) seguindo as instruções do fabricante e foram resumidas no texto abaixo:

O pó foi transferido para um tubo de 1,5 mL com 1 mL de Trizol até completar 10% do volume inicial. Essa solução foi agitada e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Então, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) o tubo foi agitado e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Após uma centrifugação de 12000 g por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL novo e o RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol (Sigma). A amostra foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol (Merck) 75% (v/v). O precipitado foi dissolvido com 200 µL de água livre de RNase e DNase.

O RNA total extraído do tecido foliar foi quantificado por espectrofotometria. Dez µL de cada solução contendo o RNA total foram diluídos em 990 µL de água em uma cubeta de espectrofotômetro e submetido à leitura por 260 nm e 280 nm de comprimento de onda. A quantidade de RNA total obtido foi calculado seguindo a relação: 1 OD = 40 µg/ml de RNA total (Sambrook e Russell, 2001).

### 3.5 REAÇÃO DE RT-PCR

#### 3.5.1 Síntese do DNA complementar

As reações de amplificação do DNA complementar (cDNA) foram realizadas através da enzima transcriptase reversa (RT) a partir do RNA total de folhas de maracujá expostas aos vapores de metil jasmonato por 12 horas. Foi utilizado para este experimento o Kit *ThermoScript RT-PCR systems* (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante:

Foram aliquotados 5 µg de cada amostra de RNA total e adicionados a eles 10 nM de Oligo(dT)<sub>20</sub>, 10 nM de dNTPs e água (Gibco) suficiente para 12 µL. Após 5 minutos a 65°C para a desnaturação do RNA, foram acrescentados a cada amostra: 5µL de tampão *first-strand buffer* 5X (250 mM Tris-acetato, pH8,4; 375 mM acetato de sódio; 40 mM de acetato de magnésio, 4 mM de DTT, 1µL de inibidor de RNase (Invitrogen) e 1µL de Thermo Script RT (375 unidades). As amostras foram submetidas à transcrição reversa por 1 hora a 60°C, seguidos de incubação por 5 minutos a 85 °C. Após a síntese do cDNA foi adicionado ao tubo 1µL de RNase H (1 unidade).

#### 3.5.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Os cDNAs produzidos no item anterior foram utilizados nas reações de PCR. Como iniciadores 3' foi utilizado o Oligo (dt)<sub>20</sub>, enquanto o iniciador 5' era constituído de oligonucleotídeos degenerado derivado da seqüência consenso **HA AVNFGQY** encontrada em LOX de vegetais (Peng *et al.*,1994 e Heitz *et al.*,1997). Esta seqüência consenso de 9 aminoácidos está localizada próxima a extremidade C-terminal da proteína.



Na reação de PCR foi utilizado o kit *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity*. As reações foram montadas com 37µL de água; 5 µL do tampão específico para a enzima *Platinum Taq* 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM

KCl); 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM; 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM e 1  $\mu\text{L}$  do iniciador degenerado (5mM).

As amplificações foram realizadas com 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minutos, anelamento dos iniciadores a 45 °C por 1 minuto e polimerização a 72 °C por 1 minuto. Todas as amplificações foram feitas em termociclador Primus 96 *PLUS*.

### 3.6 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PCR

Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1,2% (m/v), e o fragmento de aproximadamente 700 pb foi purificado do gel com o Kit *Concert Gel Extraction Systems* (Gibco) seguindo as instruções do fabricante.

### 3.7 OBTENÇÃO DO CLONE

#### 3.7.1 Ligação do inserto de 700pb com o Kit TOPO (Invitrogen)

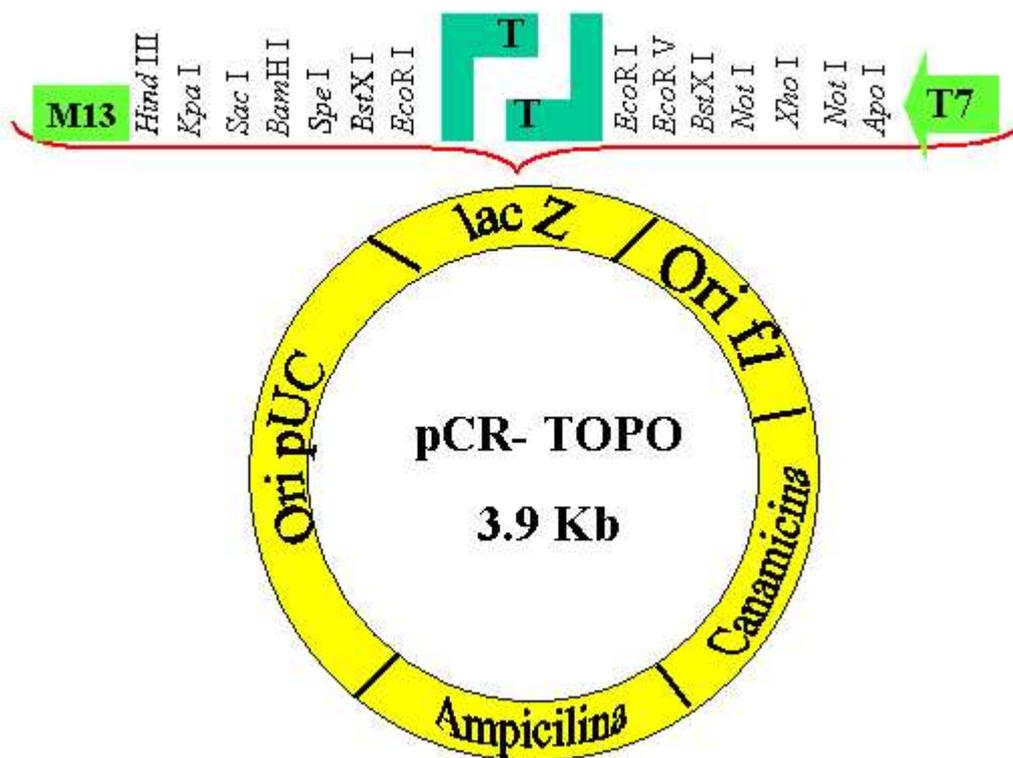
Para a clonagem de cada fragmento amplificado foi utilizado o Kit TOPO (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Inicialmente foi preparada uma reação de clonagem com volume total de 6  $\mu\text{L}$  como na tabela abaixo:

**Tabela 2:** Reagentes para ligação do inserto.

Reagente	Transformação
Inserto	3 $\mu\text{L}$
Solução salina (200 mM de NaCl; 10 mM de $\text{MgCl}_2$ )	1 $\mu\text{L}$
Água	1 $\mu\text{L}$
Vetor TOPO (Figura 6)	1 $\mu\text{L}$

A reação foi incubada por 5 minutos a 25°C e em seguida mantida em gelo até o momento de ser usada para a transformação das bactérias DH5  $\alpha$ .



**Figura 6:** Esquema do plasmídeo pCR<sup>®</sup> 2.1 - TOPO<sup>®</sup> e seus sítios de clonagem.

Fragmento *LacZ* $\alpha$ : bases 1-547

Iniciador reverse M13: bases 205-221

Promotor/iniciador T7: bases 364-383

Origem f1: bases 584-985

ORF de resistência a Canamicina: bases 1319-2113

ORF de resistência a Ampicilina: bases 2131-2991

Origem pUC: bases 3136 – 3809

### **3.7.2 Transformação das bactérias DH5 $\alpha$ por choque térmico**

Dois  $\mu\text{L}$  da reação de clonagem produzido no item anterior foram adicionados nas células competentes *One Shot* (provida no kit) previamente descongelada. Após incubação por 2 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , as células foram submetidas a um choque térmico pela incubação a  $42^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. Logo em seguida as células foram transferidas para o gelo e adicionados 250  $\mu\text{L}$  de meio SOC [triptona (2%), extrato de levedura (0.5%), cloreto de sódio (10 mM), cloreto de potássio (2.5 mM), cloreto de magnésio (10 mM) e magnésio (10 mM)] e incubado por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Cinquenta  $\mu\text{L}$  da reação de transformação foram plaqueadas em meio LB sólido [10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g NaCl e água suficiente para 1 L (pH 7,5)] contendo 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina) com 40  $\mu\text{L}$  de X-gal (40 mg/ml) e 40  $\mu\text{L}$  de IPTG (100 mM). As placas foram incubadas por 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . A identificação das colônias que possuíam os vetores recombinantes foi realizada a partir da análise da resistência ao antibiótico e funcionalidade do gene Lac Z, onde as bactérias transformadas resistentes a ampicilina produziram colônias azuis (carregavam somente o vetor) e brancas (colônias com o vetor recombinante com o fragmento de LOX).

### **3.7.3 Screening das colônias transformadas**

As colônias brancas obtidas no meio de crescimento seletivo foram repicadas em meio LB líquido (acrescido de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina) e incubadas por 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  com rotação constante de 200 rotações por minuto (rpm). Para extrair o DNA plasmidial das colônias repicadas foi utilizado o kit Concert Plasmid Extraction Systems seguindo as instruções do fabricante. A confirmação da clonagem foi realizado através de análise do padrão de restrição do plasmídeo recombinante com a enzima *EcoR* I.

## **3.8 DIGESTÃO DE DNA PLASMIDIAL**

Foi utilizado 1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial para digestão por 2 unidade de *Eco* RI em tampão específico da enzima diluído para a concentração de 1X e água suficiente para 20  $\mu\text{L}$ . Após 18 horas de incubação com temperatura de

37°C, o DNA foi precipitado por meio de adição 1/10 do volume de acetato de sódio (Merck) 3M pH 4,8 e 2 volumes de etanol (Merck). A solução, mantida a -20°C por 10 minutos, foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente.

### **3.9 SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO**

O fragmento de cDNA de ~700 pb resultante da amplificação obtido através de RT-PCR foi clonado em vetor TOPO. As colônias positivas foram selecionadas, e depois de crescidas em meio líquido, os fragmentos foram isolados em quantidade suficiente para o seqüenciamento (aproximadamente 800 ng). O seqüenciamento do fragmento de cDNA da LOx de maracujá foi realizado em colaboração da Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Paulo Vicente, no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, situado na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. No processo foram utilizados os kits de seqüenciamento *ABI Prism Dye Primer* e *Dye Terminator* (Perkin Elmer) seguindo a metodologia do fabricante; utilizando um sequenciador automático ABI Model 370 (Perkin Elmer). A análise e comparação das seqüências obtidas foi realizada com a utilização do programa GCG (Genetic Computer Group).

### **3.10 NORTHERN BLOT**

#### **13.10.1 Material vegetal**

Folhas de plantas de maracujá foram submetidas ao ferimento mecânico, com auxílio de pinça hemostática, e aos vapores de metil jasmonato por períodos diferentes (1,5; 3; 9 e 12 horas). Folhas feridas e sistêmicas (folhas adjacentes àquelas feridas) foram utilizadas para experimento de cinética do acúmulo de RNAm de LOX, bem como folhas expostas aos vapores de metil jasmonatos. Também foram utilizadas folhas de plantas submetidas à herbivoria por larvas de insetos generalista e especialistas do maracujá. Para tal, folhas injuriadas e as sistêmicas foram coletadas após um período de 12 horas do início da herbivoria. Para cada

tratamento foram utilizados grupos de três plantas de maracujá de aproximadamente um mês de germinadas.

### **3.10.2 Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante**

A agarose suficiente para 1,2% (m/v) foi dissolvido em tampão MOPS 1X (MOPS 0,1 M, pH 7, acetato de sódio 40 mM e EDTA 5mM) acrescido de formaldeído (Merck) para a concentração final de 2,2 M. A solução foi vertida a 55° C em forma apropriada para eletroforese horizontal e após a gelificação, o gel foi coberto com tampão MOPS 1X.

O volume correspondente a 15 µg de RNA total de cada amostra foi transferido para um tubo de 0,7 mL no qual foi adicionada água (Gibco) a fim de igualar os volumes das amostras. Posteriormente, foram adicionados dois volumes de tampão de desnaturação (20 µL de tampão MOPS 1X, 200µL de formamida 100%, 70 µL de formaldeído 37% e 10 µL de água). As amostras foram misturadas e incubadas a 55 °C por 1 hora. Após a incubação, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 10 minutos e então acrescidas de brometo de etídeo (200 ng/mL) e tampão de amostra 10 X (MOPS 10X, glicerol 50% e azul de bromfenol 0,025%). As amostras do RNA total foram misturadas, centrifugadas por 10 segundos a 4 °C a 10.000 xg e submetidas a uma corrida eletroforética realizada a 3 V/cm. Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma cuba e lavado por 15 minutos com água para retirar excesso de formaldeído. Finalmente a água foi substituída por SSC 10 X [citrato de sódio (0,3 M) e NaCl (3 M)] e o gel lavado por mais 5 minutos. Esta metodologia foi baseada no protocolo descrito por Sambrook e Russell em 2001.

### **3.10.3 Hibridização**

#### **3.10.3.1 Marcação de sondas por iniciadores randômicos**

O fragmento de aproximadamente 700 pb do cDNA da LOX foi clonado em vetor plasmidial pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). Os produtos da digestão (*EcoR* I) do plasmídeo contendo o fragmento de cDNA foram separados em gel de agarose 1,2%. O fragmento foi retirado do gel e purificado utilizando o kit *Concert Gel Extraction Systems* (Gibco). A marcação radioativa do inserto purificado foi realizada com a utilização do kit *Random Primer DNA Labeling System* (Gibco). O kit é provido de DNA polimerase (fragmento *Klenow*), iniciadores hexâmeros aleatórios e dNTPs. Foi utilizado dCTP radioativo ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ) e os outros três nucleotídeos não marcados (dATP, dTTP e GTP) como precursores da reação. A sonda continha a região 3' do cDNA de LOX de maracujá e foi utilizada para todas as análises de LOX.

#### **3.10.3.2. Purificação de DNA marcado radiotivamente**

As moléculas de DNA com nucleotídeos radioativos incorporados foram separadas dos nucleotídeos não-incorporados através de precipitação. O DNA foi precipitado com auxílio de 20  $\mu\text{g}$  de glicogênio usado como carreador. Depois de adicionado o glicogênio foi colocado 1/10 volume de acetato de sódio (3M) pH 4,8 e de 2 volumes de etanol. A solução foi mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12.000 xg. O precipitado foi então ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de TE 1X e 1  $\mu\text{L}$  dessa solução foi retirada para a contagem da radioatividade incorporada por cintilação líquida. Essa alíquota de 1  $\mu\text{L}$  foi aplicada em papel Whatman G/FA, este foi seco com infravermelho e imerso em recipientes de vidro contendo solução de cintilação (PPO 0,05% em tolueno). Esse recipiente foi colocado em contador Beckman modelo LS-150, que indicava o valor da marcação em cintilações por minutos (CPM).

### 3.10.3.3 Reação de hibridização à sonda homóloga

A membrana, contendo ácidos nucleicos transferidos do gel, foi colocada em sacos plásticos, com a 1 mL de solução de pré-hibridização [fosfato de sódio (50 mM) pH 6,8; solução de Denhart 5X (polivinilpirrodina (PVP) 0,1%, ficol 0,1% e albumina sérica bovina (BSA) 0,1%; formamida 50 %, SSC 5%, DNA de esperma de arenque 1 $\mu$ g/mL] durante 1 hora a 42 °C. Após a pré-hibridização, foi adicionado solução de SDS 0,1% e a sonda marcada, previamente aquecida a 95°C por 5 minutos. A reação de hibridização ocorreu por 18 horas a 42°C.

Após a hibridização, a membrana foi lavada com a solução de lavagem (SSC 0,1X e SDS 0,1) por 15 minutos a 42 °C por duas vezes consecutivas. A membrana foi acomodada em cassete apropriado, coberta com um filme de raio X (Kodak T-Mat S) e com tela intensificadora (*lightning Plus*, Du Pont). A exposição ocorreu a -70°C por tempos variados.

### 3.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS FOLIARES

Folhas de plantas controle, submetidas à herbivoria e aos vapores de metil jasmonato foram submetidas a extração protéica baseado na metodologia descrita por Jacinto e colaboradores em 1998. Cem mg de folhas foram maceradas, utilizando almofariz e pistilo, na presença de nitrogênio líquido. Foi adicionado polivinilpolipirrolidona (10% do peso da folha) e o conteúdo protéico total foi extraído pela adição de 3 mL de solução de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 a 4 °C para cada grama de folha. O material foi homogeneizado suavemente durante alguns minutos e mantido no gelo, sendo em seguida centrifugado durante 30 minutos a 10.000 x g, 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. Os extratos brutos obtidos após a extração de folhas submetidas à herbivoria foram reservados para experimento de atividade *in vitro*.

## **3.12 PURIFICAÇÃO DA LIPOXIGENASE EM MARACUJÁ**

### **3.12.1 Precipitação de proteínas com sulfato de amônia**

Plantas tratadas com metil jasmonato durante 48 horas foram submetidas à extração protéica como descrito no item 3.11. As proteínas extraídas foram precipitadas utilizando sulfato de amônio. Foi adicionado inicialmente sulfato de amônio numa concentração suficiente para atingir uma saturação de 20%. A solução permaneceu sob suave agitação durante 3 horas a 4° C. O material obtido foi centrifugado a 1.000 xg durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a ele foi adicionado sulfato de amônio para se atingir uma saturação de 55%. Após uma agitação por 3 horas a 4° C, o precipitado foi coletado e a ele adicionado à solução Tris-HCL 50mM, pH 8,0.

### **3.12.2 Cromatografia em coluna Sephadex G-200**

A fração obtida após a saturação de 20 a 55% de sulfato de amônio foi submetida a uma cromatografia de gel filtração em uma coluna Sephadex G-200 previamente equilibrada com solução Tris-HCL 50mM, pH 8,0, sob fluxo de 0,5 mL por minuto. As frações coletadas foram monitoradas a 280 nm, para quantificação protéica e utilizadas para atividade de lipoxigenase. As frações obtidas na cromatografia com a atividade específica de LOX foram concentradas utilizando ultrafiltração por colunas de Centricom (50.000 MW, Milipore), seguindo as instruções do fabricante.

## **3.13 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LOX *IN VITRO***

A atividade de LOX foi medida por espectrofotômetro usando ácido linoléico (10mM) como substrato, segundo metodologia adotada por Rangel e colaboradores (2002). Por este método foi quantificado o aumento da absorbância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Basicamente, 5  $\mu$ L de extrato bruto foram adicionados a uma mistura de 1 mL do tampão de reação enzimática (Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e 40  $\mu$ L da solução estoque de ácido linoléico 10 mM. A absorbância a 234 nm foi determinada no tempo inicial (tempo 0) e após 1, 2 e 3 minutos. Uma unidade de atividade de LOX foi definida como a quantidade de enzima que gera 1  $\mu$ mol de hidroperóxidos por minuto, a 25°C.

### **3.14 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR SDS-PAGE**

Os conteúdos protéicos foram analisados em gel de poliacrilamida 10%, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram solubilizadas em solução de amostra contendo Tris-HCl (0,0625M) pH 6.8, glicerol 10%, ABF 0,001%, SDS 2% e  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, aquecidas a 100 °C durante 3 minutos e centrifugados por alguns segundos. Como padrão de peso molecular foi utilizado o kit *Pharmacia Biotech*, com faixa de peso molecular variando de 14,4 a 94,0 kDa. A corrida eletroforética foi iniciada aplicando-se uma corrente constante de 180 Volts por aproximadamente 45 minutos.

### **3.15 COLORAÇÃO PELO AZUL DE COOMASSIE**

Após a corrida eletroforética, os géis foram imerso em solução contendo *Coomassie Brilliant Blue R* 0,2% (Bio-Rad) em metanol 45% (Merck) e ácido acético 10% (Merck), por cerca de 30 minutos. Em seguida, os géis foram imersos em solução descorante de metanol 5% e ácido acético 7%.

### **3.16 DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

Para este experimento foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). A dosagem da amostra foi feita conforme instruções do *kit Bio-Rad Protein Assay*. A absorbância foi determinada a 595nm. A curva padrão foi realizada utilizando-se BSA de acordo com instruções do *kit Bio-Rad Protein Assay*.

### **3.17 OBTENÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI-LOX DE MARACUJÁ**

A proteína lipoxigenase foi previamente semipurificada através de cromatografia Sephadex G-200. Após a eletroforese, as bandas referentes a LOX foram retiradas do gel, maceradas em um almofariz e acrescentada 200  $\mu$ L de hidróxido de alumínio como adjuvante. A solução foi inoculada em um coelho (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, em uma primeira dose intramuscular e após 30 dias uma segunda dose subcutânea. Aos 45 dias do início da imunização o animal recebeu a terceira dose idêntica à segunda. A sangria de prova foi realizada na veia marginal da orelha do animal em um volume aproximado de dois mL, dois dias após a terceira dose. O sangue foi mantido a 37° C por 2 horas para coagular e após 12 horas a 4° C o soro imune foi obtido através de centrifugação a 19.000 xg por 20 minutos. Após 15 dias do quarto reforço o coelho foi sacrificado por punção cardíaca, seu sangue reservado para separação do soro. O soro imune foi obtido através de centrifugação a 19.000 xg por 20 minutos.

Os anticorpos foram submetidos a testes de titulação em experimentos de detecção em membrana, alcançando a titulação apropriada.

### **3.18 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR IMUNODETECÇÃO**

As análises por imunodeteção foram feitas conforme a metodologia descrita por Towbin e colaboradores em 1979. Após a separação por eletroforese, os extratos protéicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose. A eletrotransferência foi realizada utilizando solução fosfato 0,05 M, pH 7,4 por 2 horas a 10 Volts constantes. A membrana foi inicialmente incubada com tampão de bloqueio (Tris 20 mM, NaCl 150 mM; leite em pó desnatado comercial 5%, pH 7,5) durante 2 horas. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal contra LOX de maracujá diluído 1:5000 em tampão de bloqueio, por 2 horas. Após a incubação com o anticorpo, a membrana foi lavada 5 vezes, a cada 10 minutos com solução de lavagem (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Posteriormente, a membrana foi incubada com proteína A-peroxidase 1mg/mL, diluída 1:1000 em tampão de bloqueio, por 2 horas. A revelação das bandas imunoreativas foi feita utilizando o kit de

quimiluminescência (Amersham ECL reagent) conforme instruções do fabricante.

### **3.19 QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO JASMÔNICO HIDROGENADO (H<sub>2</sub>AJ) , ÁCIDO JASMÔNICO METILADO (MEAJ) E ÁCIDO JASMÔNICO HIDROGENADO METILADO (H<sub>2</sub>MEAJ)**

#### **3.19.1 Ácido jasmônico hidrogenado padrão**

O ácido jasmônico (40 mg) foi dissolvido em 1 mL de metanol, ao qual foram adicionadas 4 mg de catalisador Pd/C (10%) (Aldrich). A mistura foi colocada sob agitação em um reator em atmosfera de hidrogênio à pressão de 4 atm (atmosfera) por 3 horas. O ácido jasmônico hidrogenado formado foi analisado por cromatografia gasosa acoplado com espectômetro de massa (CG/MS).

#### **3.19.2 Ácido jasmônico metilado e ácido jasmônico hidrogenado metilado padrão**

##### **3.19.2.1 Preparação do diazometano**

A um balão de destilação de 500 mL, equipado com condensador de tubo reto (sem juntas esmerilhadas), contendo uma solução de 9,96 mols de N-metil-N-nitroso-para-tolueno-sulfonamida (Diazald, 21,5 g) em 240 mL de éter etílico foi adicionado uma solução de KOH (0,09 mols) em 7 mL de água destilada e 25 mL de etanol. A seguir esta mistura foi aquecida em torno de 35 °C em um banho de água quente a 45 °C e a solução destilada de diazometano foi coletada em frasco sob banho de gelo.

##### **3.19.1.2 Metilação dos compostos**

O AJ ou o H<sub>2</sub>AJ (20 mg) reagiram com excesso de diazometano em agitação e as reações foram mantidas em repouso por 12 horas à temperatura ambiente. A formação de MeAJ e H<sub>2</sub>MeAJ foi verificada por CG/MS.

### **3.19.3 Extração do ácido jasmônico e metil jasmonato de folhas de maracujá**

Aproximadamente 100 mg de material vegetal mantido em N<sub>2</sub> foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo e na presença de 500 µL de solução de extração (1-propanol/água/HCl concentrado 2:1:0,002 v/v/v). Nesta etapa foi adicionado 20 ng dos padrões internos H<sub>2</sub>AJ e H<sub>2</sub>MeAJ. Esta mistura foi agitada por 30 min a 4 °C e em seguida 1 mL de diclorometano foi adicionado e agitada novamente por 30 min. As amostras foram centrifugadas a 13.000 xg por 5 min. A fase orgânica foi retirada, seca e ressolubilizada em 300 µL de metanol.

### **3.19.4 Análise e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas seqüencial (CLAE/EM-EM)**

A detecção dos compostos foi efetuada utilizando-se o sistema CLAE/EM-EM em seqüência com ionização por *electrospray* no modo MRM (*multiple reaction monitoring*). O íon molecular desejado foi coletado pelo primeiro quadrupolo e então fragmentado em um segundo quadrupolo que estava submetido a uma pressão baixa de argônio (célula de colisão). Um terceiro quadrupolo estava ajustado para detectar somente os íons filhos majoritários do composto de interesse. O sistema constituía-se de duas bombas analíticas Shimadzu 10 Avp acopladas a uma coluna Luna C18 (2)-HST 100 x 3,0 mm a 25 °C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila + 0,05 % ácido fórmico e água + 0,05 % de ácido fórmico em gradiente no qual de 0 a 18 min a concentração de acetonitrila foi de 50 a 100 %, com fluxo total de 200 µl. A análise por EM-EM (Micromass, Altrichan, UK) foi realizado em modo *electrospray* negativo para as amostras AJ, H<sub>2</sub>AJ e OPDA e positivo para Me AJ e H<sub>2</sub>MeAJ, com voltagem de cone 30 V. O potencial da célula de colisão foi programado para 20 V e 25 V, respectivamente, para o modo negativo e positivo. Os potenciais do capilar e do eletrodo HV estavam ajustados a 5 e 0,5 kV. O gás nitrogênio de nebulização e secagem foram de 250 e 30 l/h. As

massas moleculares e as transições monitorados para cada composto foram descritas na tabela a seguir.

<b>Composto</b>	<b>Modo de ionização</b>	<b>Transição</b>	<b>Padrão Interno</b>	<b>Modo de ionização</b>	<b>Transição</b>
AJ	negativo	209 →59	H <sub>2</sub> AJ	negativo	211 →59
MeAJ	positivo	225 →151	H <sub>2</sub> MeAJ	positivo	227 →153
OPDA	negativo	291 →165	H <sub>2</sub> AJ	negativo	211 →59

A quantificação do AJ e MeAJ foi realizada a partir de uma curva padrão construída com diferentes concentrações de AJ e MeAJ com os seus respectivos padrões internos.

## **4. RESULTADOS**

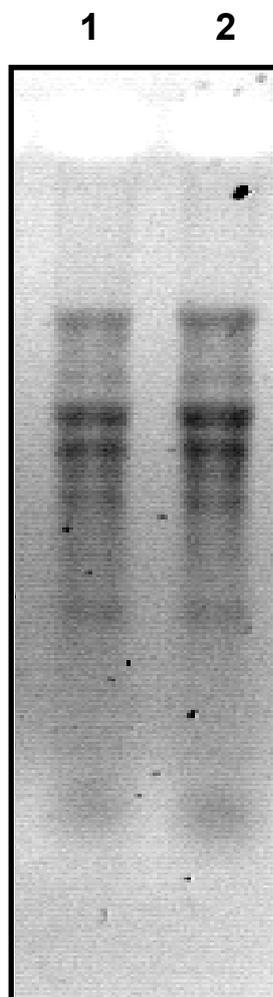
### **4.1 Extração de RNA total do tecido foliar**

A eletroforese em gel de agarose 1,4% (m/v) desnaturante foi utilizada para a análise da integridade do RNA total obtido com o reagente Trizol. A figura 7 mostra o padrão de bandas dos RNAs obtidos após a eletroforese, e podemos observar que não ocorreu degradação durante a metodologia de extração.

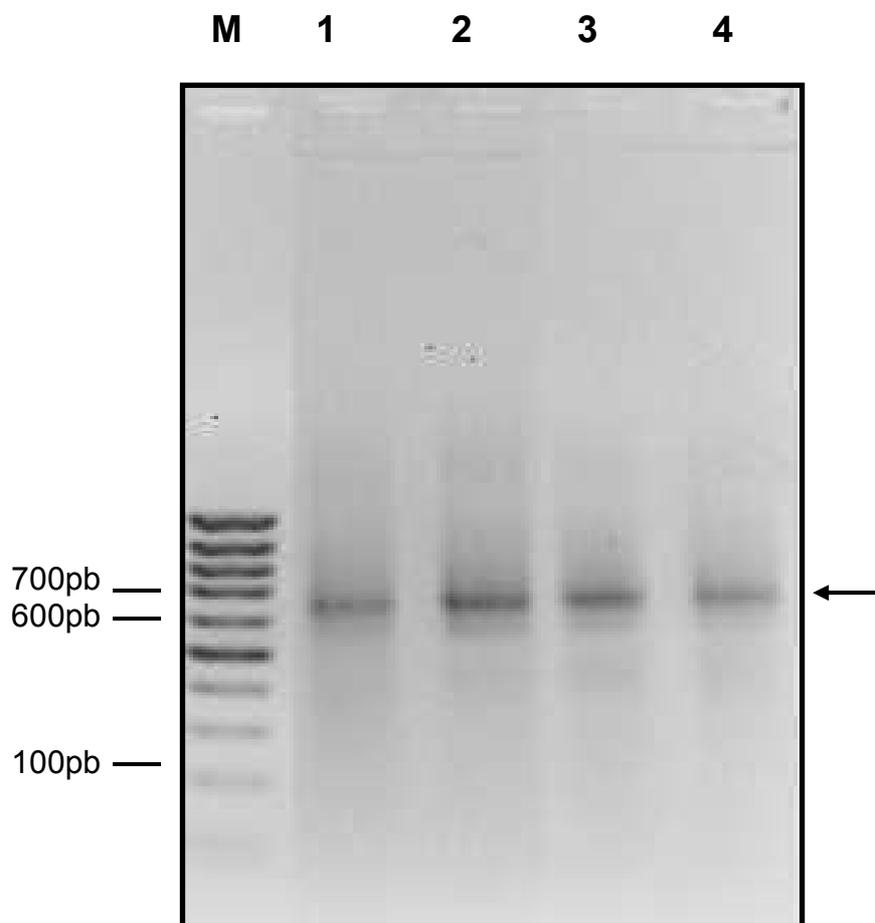
### **4.2 CLONAGEM DO FRAGMENTO DE CDNA DE LOX**

O RNA total de folhas de maracujá expostas aos vapores de metil jasmonato por 12 horas foi utilizado para transcrição reversa. O cDNA produzido foi utilizado para PCR com um iniciador oligo (dt)<sub>20</sub> e um iniciador degenerado derivado de uma seqüência de aminoácido consenso HAAVNFGQY, a qual está presente na região C-terminal das várias seqüências LOX vegetais. Na Figura 8 pode ser observado que a reação de RT-PCR resultou na amplificação de um único fragmento de aproximadamente 700 pb.

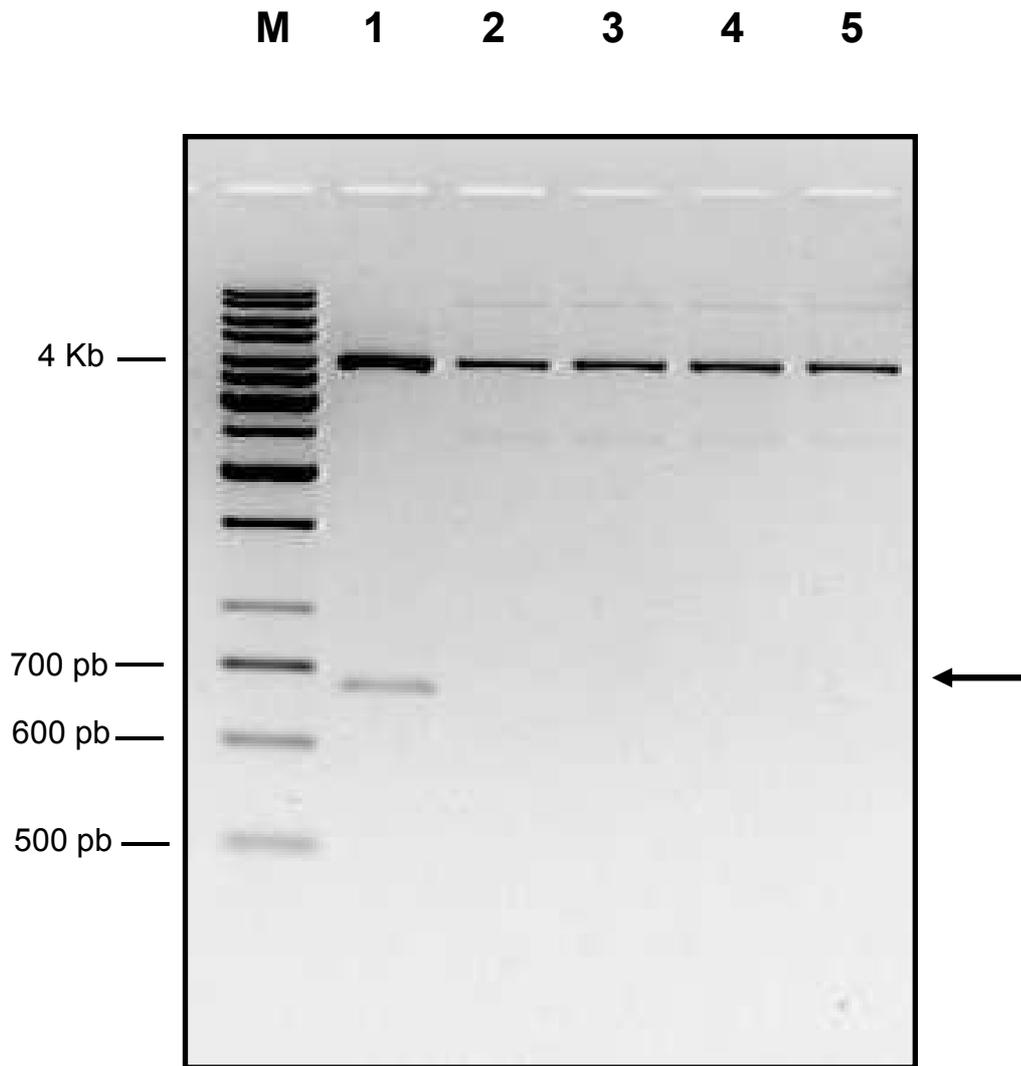
Após a clonagem do fragmento de aproximadamente 700 pb no vetor pCR 2.1, foram obtidas quatro colônias brancas (recombinantes). Os DNAs plasmidiais oriundos dessas colônias foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* e analisados em gel de agarose 0,8% (m/v). Como podemos observar na Figura 9, apenas um clone entre os quatro obtidos continha o fragmento de cDNA de 700 pb clonado (raias 1 - 4). Como controle negativo, foi digerido o DNA plasmidial oriunda de uma colônia azul (não recombinante) (raia 5).



**Figura 7: Avaliação da integridade do RNA total extraído do tecido foliar de plantas de maracujá.** As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1,4% (m/v) desnaturante. Raias **1 e 2)** 6 $\mu$ g de RNA total extraído de plantas após 12 horas de exposição ao metil jasmonato. A figura mostra duas extrações independentes. Os RNAs foram visualizados por coloração com brometo de etídeo 10 mg/mL.



**Figura 8: Análise do perfil de amplificação da LOX de maracujá.** Raia **M**) Marcador 100 pb Ladder (100 ng) (Invitrogen). **1 - 4**) 10 $\mu$ L do produto de RT-PCR de quatro amplificações independentes. A seta indica a amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb correspondente a LOX. As amostras foram separadas em gel de agarose 1,2% (m/v) contendo brometo de etídeo 10 mg/mL.



**Figura 9: Padrão de digestão enzimática do DNA plasmidial proveniente de colônias transformadas. M)** Marcador 100 pb Ladder (100 ng) (Invitrogen), **1)** 100 ng de DNA plasmidial, de colônia positiva, digerida com *Eco* RI. **2-4)** 100 ng de DNA plasmidial de colônias brancas, falso positivas, digerida com *Eco* RI. **5)** 100 ng de DNA plasmidial de colônia azul, não transformadas, (somente o vetor) após digestão com *Eco* RI. A seta indica a posição do inserto liberado após a digestão enzimática. As amostras foram separadas em gel de agarose 1,2% (m/v) contendo brometo de etídeo 10 mg/mL.

## 4.2 SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO OBTIDO VIA RT-PCR

O clone 1 (Figura 9) foi submetido ao seqüenciamento automático de DNA, sendo possível determinar uma seqüência de 673 nucleotídeos (Figura 10). Com este trecho de cDNA disponível, analisamos as possíveis traduções utilizando um programa específico (Figura 10). Com a seqüência deste cDNA, foi possível ter acesso a seqüência deduzida de aminoácidos para a busca de seqüências similares em bancos internacionais de dados. As seqüências de aminoácidos para diferentes espécies vegetais: *Nicotiana tabacum* (NtLOX; acesso nº AY254348.1), *Passiflora flavicarpa* (PfLOX; acesso nº AF119041.1), *Arabidopsiss thaliana* (AtLOX; acesso nº AJ249794.1), *Oryza sativa* (OsLOX; acesso nº AF095895.1), *Solanum tuberosum* (StLOX; acesso nº X95516.1) e *Lypopersicon esculatum* (LeLOX; acesso nº FG591714.1); foi utilizado para alinhamento das mesmas (<http://mbrc.bcm.tmc.edu/searchlaucher>). Essa comparação preliminar revelou uma similaridade entre a seqüência deduzida de aminoácidos de nosso fragmento com diversas seqüências parciais de lipoxigenases de origem vegetal. Na figura 11 demonstramos a seqüência de aminoácidos deduzidas do fragmento de aproximadamente 700 pb quando alinhado com seqüências de aminoácidos de LOX vegetais anteriormente descritas.

1	CAC GCT GCG GTG AAT TTT GGT CAG TAT	GAA TAT GGA GGC TAC TTC CCC
	H A A V N F G Q Y	E Y G G Y F P
49	AAC CAT CCA TCA ATA GCT CGA ATC AAC ATG CCA ACC GAG GAC TTT TCA	
	N H P S I A R I N M P T E D F S	
97	GAG GAA GAG TTC AAG GAA CTC TTG AGG AAA CCA GAA GAC ACA TTG CTG	
	E E E F K E L L R K P E D T L L	
145	AAA TGC TTC CCT TCT CAG CTT CAG GCA TTG CGA GTG ACT GCC ATC TTG	
	K C F P S Q L Q A L R V T A I L	
193	GAA ATT TTG TCT AGC CAT TCA CCT GAT GAA GAG TAC ATA GCT GAT AAA	
	E I L S S H S P D E E Y I A D K	
241	TTG GAG GCA TAC TGG GAA GAT GAA GCA GTG ATA AAG GCT GCC TTT GAA	
	L E A Y W E D E A V I K A A F E	
289	AGG TCC AAC GGA AGG ATC AAG GAA CTG GAG GGG ACA ATT GAT GAC AGG	
	R S N G R I K E L E G T I D D R	
337	AAC AGT GAT CTT GAT TTG AAA AAT AGG AGC GGA GCT GGA GTG ATC CCG	
	N S D L D L K N R S G A G V I P	
385	TAT GAG CTC CTC AAG CCT TAC TCT ACG CCT GGG GTT ACT GGA AAG GGA	
	Y E L L K P Y S T P G V T G K G	
433	GTT CCC AAT AGC ATC TCC ATT TAG	TTG GAT CAT TGT CAG TTC AAT GAA
	V P N S I S I -	L D H C Q F N E
481	GTG GTG AAA TCA TAT GAA ATA AGT TCA TTG AAC TAA TAA	ATT ATG GGA
	V V K S Y E I S S L N - -	I M G
529	CTT TTG GTT CCA GAT ATG TCC ATC AAA ACC AAA AGG CAT TAG	TAT CTT
	L L V P D M S I K T K R H -	Y L
577	TCT ATA CCT ATG TAT TAT TAG	AAG GAT TTG ATA AAT CCG TAC GGA AAA
	S I P M Y Y -	K D L I N P Y G K
625	ACA ATA AAG TAT TGG TGT CTT CGA TAA	
	T I K Y W C L R -	

**Figura 10: Sequência de nucleotídeos obtidos a partir do fragmento de aproximadamente de 700pb.** A região em azul refere-se a seqüência do iniciador degenerado desenhado para as reações de RT-PCR. A seqüência de poliadenilação está marcada em verde, e os possíveis *stop-codons* estão em vermelho. Abaixo da seqüência de nucleotídeos estão os aminoácidos correspondentes a cada códon.

```

NtLOX      HAAVNFQQYSYAGYFPNRPTTARAKMPTEDPTD-EEWENFLKRPEDALLKCFPSQMQATK
PfLOX      HAAVNFQQYEGGYFPNHPSIARINMPTEDFSE-EEFKELLRKPEDTLLKCFPSQLQALR
LeLOX      HAAVNFQQYGGYFPNRPTTTRIRMPTEPTD-EALKEFYESPEKVLTKYPSQKQATL
AtLOX      HAAVNFQQYGGYFPNRPTTTRIRMPTEPTD-EALKEFYESPEKVLTKYPSQKQATL
OsLOX      HAAVNFQQYDFGGYFPNRPSIARTVMPVEEPVDGAAMERFLDNPQRLRECFFSQVQATV
StLOX      HAAVNFQQYPYAGYVFNRPVSRFRMPEPGTPE---YEELKRNPKAFLKTITAQLQTL
***** :.**,**:*: :* **      :   :.: *:. :. : .* *:

NtLOX      VMAILDVLNHSHPDEEYIGEKIEPYWAEDPVINAAFEKFSGRLEKEGIIDGRNADSNLM
PfLOX      VTAILEILSSHSPDEEYIADKLEAYWEDEAVIKAAFERSNGRIKELEGTIDDRNSDLDK
LeLOX      VMVTLDLLSTHSPDEEYIGEQEASWANEPVINAAFEKFKGLQYLEGVIDERNVNITLK
AtLOX      VMVTLDLLSTHSPDEEYIGEQEASWANEPVINAAFEKFKGLQYLEGVIDERNVNITLK
OsLOX      VMAVLDVLSSHSTDEEYLGGEQTRPUNSDAAVQAAAYDGFARLKEIEGVIDGRNKDRKLK
StLOX      GVSLEILSRHTTDEIYLGQRESPEWTKDKEPLAAFDRFGKCLTDIEKQIIQRNGDNILT
      :.:** *:.** *:. .   * .:   **::   ::   :* * ** : *

NtLOX      NRNGAGVVPYELLKPFSGPGVTGKGVPSIS I
PfLOX      NRSGAGVIPYELLKPYSTPGVTGKGVPSIS I
LeLOX      NRAGAGVVKYELLKPTSEHGVTGMGVPSIS I
AtLOX      NRAGAGVVKYELLKPTSEHGVTGMGVPSIS I
OsLOX      NRCGAGILPYQLMKPFSDSGVTGMGIPNSTS I
StLOX      NRSGPVNAPYTLFPPTSEGGLTGKGIPIVSVS I

```

**Figura 11: Comparação das seqüências de aminoácidos deduzida de LOX de diferentes espécies vegetais.** As seqüências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW 1.18 disponível em <http://mbrc.bcm.tmc.edu/searchlaucher>. As seqüências de LOX alinhadas foram: *Nicotiana tabacum* (NtLOX; acesso nº AY254348.1), *Passiflora flavicarpa* (PfLOX; acesso nº AF119041.1), *Lycopersicon esculentum* (LeLOX; acesso nº FG591714.1), *Arabidopsis thaliana* (AtLOX; acesso nº AJ249794.1), *Oryza sativa* (OsLOX; acesso nº AF095895.1) e *Solanum tuberosum* (StLOX; acesso nº X95516.1). Os aminoácidos conservados de LOX vegetal estão indicados com um asterisco (\*) os aminoácidos diferentes entre as espécies analisadas estão indicados por dois pontos (:). O retângulo mostra a seqüência de 9 aminoácidos conservados entre as LOX nas diferentes espécies.

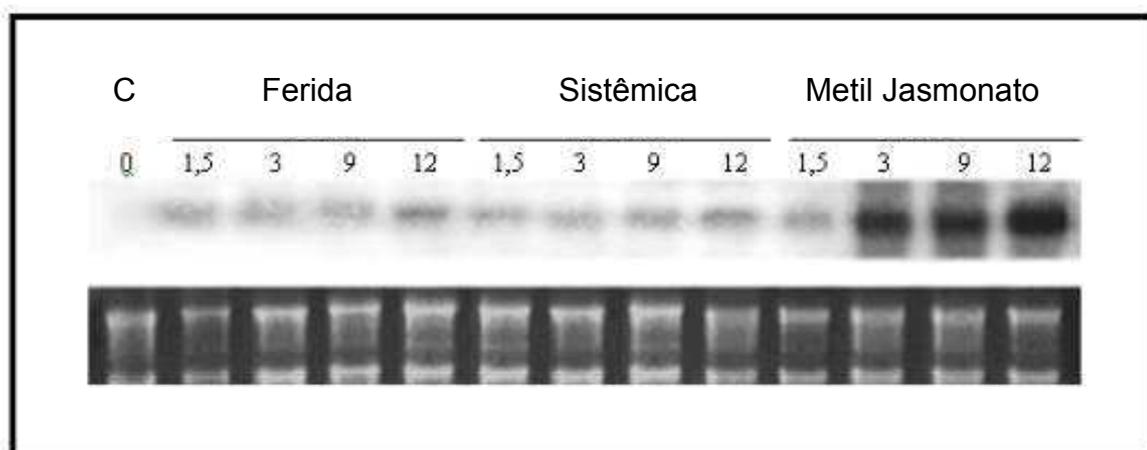
### **4.3 EXPRESSÃO DO GENE LOX EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM METIL JASMONATO, FERIMENTO MECÂNICO E HERBIVORIA.**

#### **4.3.1 Expressão temporal do gene da LOX em folhas de maracujá**

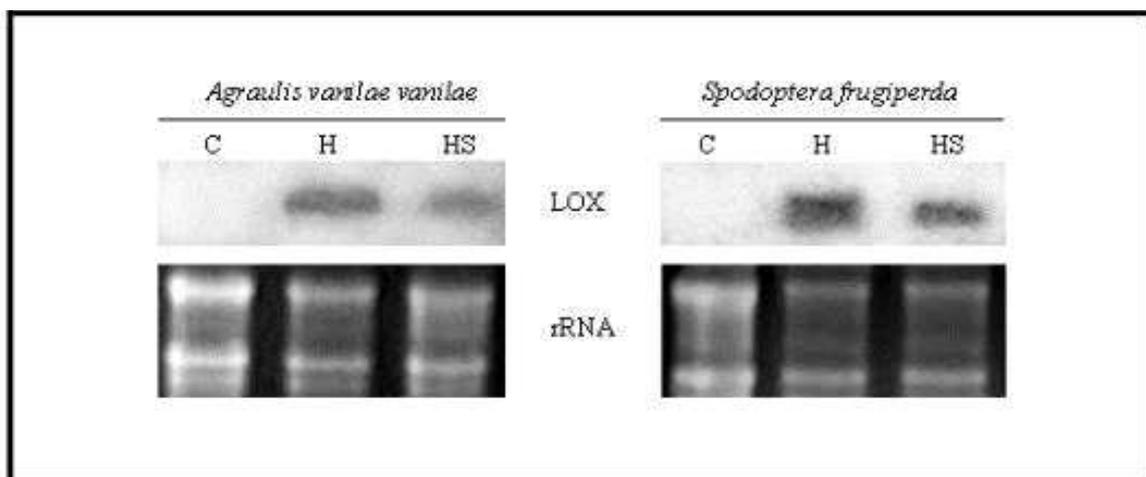
A cinética do acúmulo do RNAm de LOX em folhas de maracujá em resposta ao tratamento com metil jasmonato e ferimento mecânico foi estudado pela técnica de *Northern blot* (Figura 12). O resultado mostra que os transcritos de LOX foram detectados em todas os tempos analisados para folhas feridas e em folhas sistêmicas, porém, é possível observar um acréscimo após 12 horas de tratamento. Nas plantas tratadas com metil jasmonato, observa-se um aumento na indução desses transcritos a partir de 3 horas de exposição ao tratamento, com maior nível de indução após 12 horas de tratamento.

#### **4.3.2 Perfil da expressão do gene LOX em resposta a herbivoria**

Para avaliar a indução do gene da LOX em resposta a herbivoria, folhas de plantas de maracujá foram utilizadas para alimentação de lagartas de espécies diferentes. A lagarta *Spodoptera frugiperda* tem como preferência em sua dieta folhas de milho (*Zea mays*) porém é conhecida por ter hábitos generalistas. A lagarta *Agraulis vanillae vanillae* é especialista para alimentação com folhas de maracujá. Na Figura 13 foi demonstrado o acúmulo de transcritos da LOX sob influência das duas espécies tanto em folhas com sinais de predação (H), bem como em folhas sistêmicas (HS), após 12 horas em contato com as lagartas. Pode-se observar um maior acúmulo dos transcritos nas folhas feridas em relação às folhas sistêmicas, para os dois tipos de lagartas. Esse resultado mostra que o gene LOX é induzido principalmente em folhas feridas e predadas. Porém a resposta da planta ocorre também em folhas sistêmicas, uma vez que foi possível observar o acúmulo de RNAm para LOX nas folhas sistêmicas.



**Figura 12: Perfil de expressão do gene LOX em resposta ao tratamento com metil jasmonato e ferimento mecânico e suas folhas sistêmicas.** Em intervalos específicos em um período de 12 horas, amostras de RNA foram coletadas. Foram utilizados tratamentos com metil jasmonato e ferimento mecânico. Todas hibridizadas com sonda LOX de maracujá.



**Figura 13: Perfil de expressão do gene em resposta a herbivoria.** Indução de transcritos da LOX em resposta a ação de insetos herbívoros (especialista e generalista, respectivamente) após 12 horas de alimentação. **C)** folhas intactas **H)** folhas com sinal de predação **HS)** folhas intactas de plantas expostas às larvas herbívoras. Todas hibridizadas com sonda radiomarcada LOX de maracujá.

#### **4.4 INDUÇÃO DA ATIVIDADE DE LOX POR HERBIVORIA**

Plantas de maracujá foram submetidas à herbivoria por lagartas das espécies *Agraulis vanillae vanillae* e *Spodoptera frugiperda* durante 24 e 48 horas. Folhas com sinais de predação e folhas sistêmicas foram coletadas, e suas proteínas extraídas em três experimentos independentes. Para a detecção da proteína LOX foi realizado ensaio de atividade enzimática com ácido linolênico como substrato. A figura 14 (A e B) demonstra que a atividade de LOX em folhas controles foi detectada em níveis baixos, quando comparada aos outros tratamentos. A atividade enzimática de LOX em folhas submetidas à herbivoria foi cerca de 8 vezes maior que a atividade em folhas controle. Nas plantas submetidas a herbivoria foram observados diferenças bem próximas na atividade de LOX entre plantas induzidas por 24 horas e as de 48 horas. Em um contexto geral pode-se avaliar como análogos os níveis de atividade de LOX em plantas predadas por ambas as espécies de lagartas utilizadas para o ensaio. As diferenças entre as atividades de LOX foram avaliadas estatisticamente pelo teste *t* obtendo significância de  $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ .

#### **4.5 ANÁLISE, EM SDS-PAGE, DO ACÚMULO DA PROTEÍNA LOX EM RESPOSTA A HERBIVORIA**

Cerca de 35 µg de extratos brutos das proteínas extraídas das plantas submetidas a herbivoria foram separados por eletroforese em SDS-PAGE (10%) e corados por *Coomassie brilliant blue*. Pode ser observado, na Figura 15, que o padrão de bandas apresentado permanece similar em folhas submetidas a herbivoria e folhas sistêmicas. Em todos os casos foram utilizados grupos de três plantas para cada extração protéica. A proteína LOX tem cerca de 94 Kd, indicada pela seta. Pode-se observar a ausência da banda de 94 Kd na amostra controle e a presença da mesma nas amostras predadas (H) e sistêmicas (HS) para os dois tempos analisados (24 horas e 48 horas). É possível notar que a proteína LOX é acumulada em folhas predadas (H) em níveis ligeiramente maiores que as folhas sistêmicas (HS).

#### 4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA PROTEÍNA LOX DE MARACUJÁ

Anticorpos policlonais foram desenvolvidos a fim de estudarmos os níveis de acúmulo da proteína LOX de maracujá em resposta a diferentes condições de estresse, via experimento de *Western Blot*. A Figura 16 mostra que anticorpos policlonais contra LOX de maracujá reagiram com proteínas inespecíficas em várias diluições dos anticorpos.

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO

Nestes experimentos fez-se necessário o uso de ácido jasmônico dihidroxigenado padrão a fim de comparar com espectro de massas do ácido jasmônico extraído. Na Figura 17 mostra os espectros do ácido jasmônico (A) e do ácido jasmônico diidrogenado utilizado como padrão. O espectro de massas apresentou, entre outros sinais, o íon molecular  $m/z$  209  $[M]^+$  confirmando a massa calculada de fórmula  $C_{12}O_3H_{18}$ . O conjunto desses dados confirma a estrutura do produto obtido (Figura 17).

A detecção do ácido jasmônico foi efetuada utilizando-se o sistema CLAE/EM-EM em seqüência com ionização por *electrospray* no modo MRM (*multiple reaction monitoring*). Plantas contendo duas folhas expandidas foram feridas mecanicamente e congeladas em nitrogênio líquido. A porção de folhas tanto no controle quanto a folha ferida possuíam o peso de aproximadamente 100 mg. A detecção após o ferimento mecânico, em uma cinética temporal (15, 60, 90, 120 e 180 minutos após a indução) foi analisada para a quantidade de ácido jasmônico produzido (Figura 18). Nas folhas controle foi observado um nível basal de ácido jasmônico. Após a ferida observa-se (Figura 18) um constante acréscimo dessa substância até 60 minutos após o estímulo, após esse período nota-se um decréscimo na produção de ácido jasmônico até o tempo final de 180 minutos.

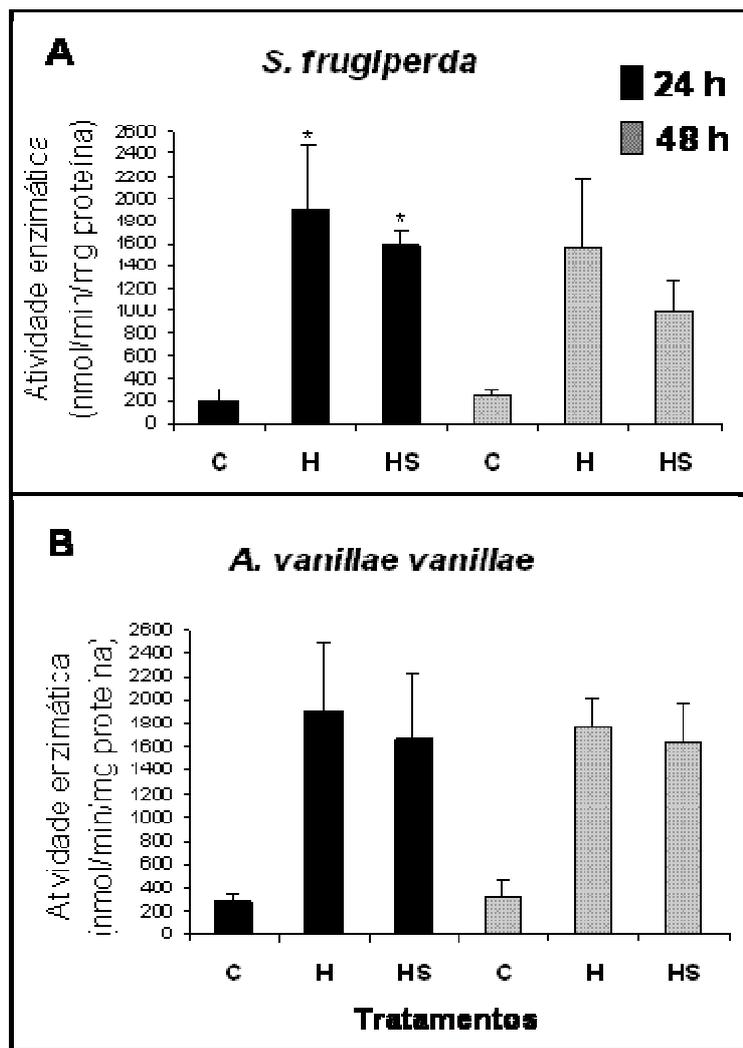
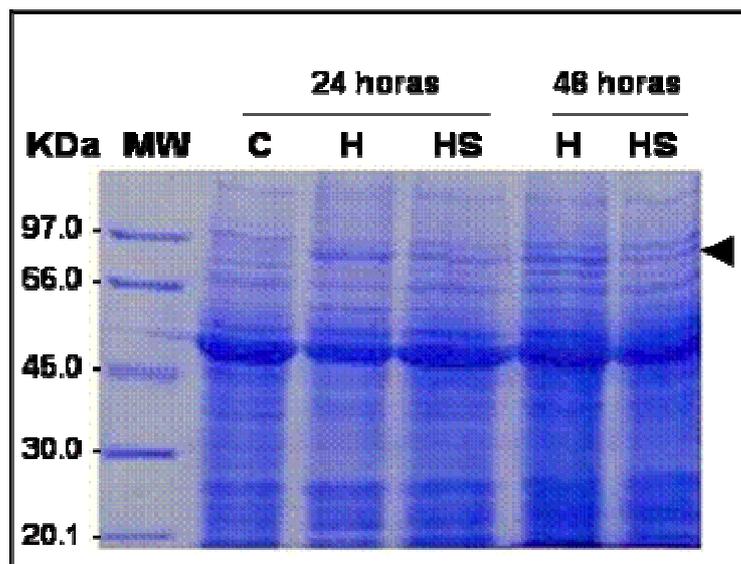
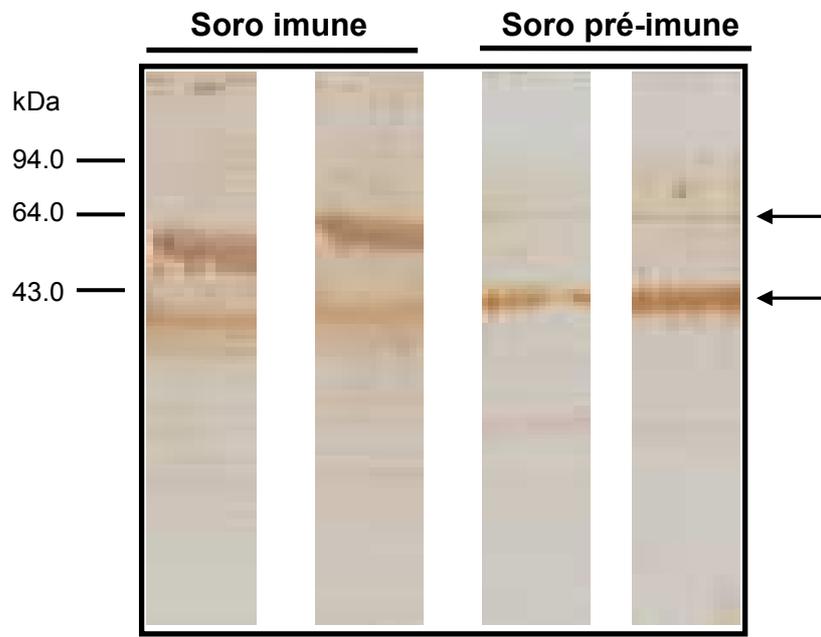


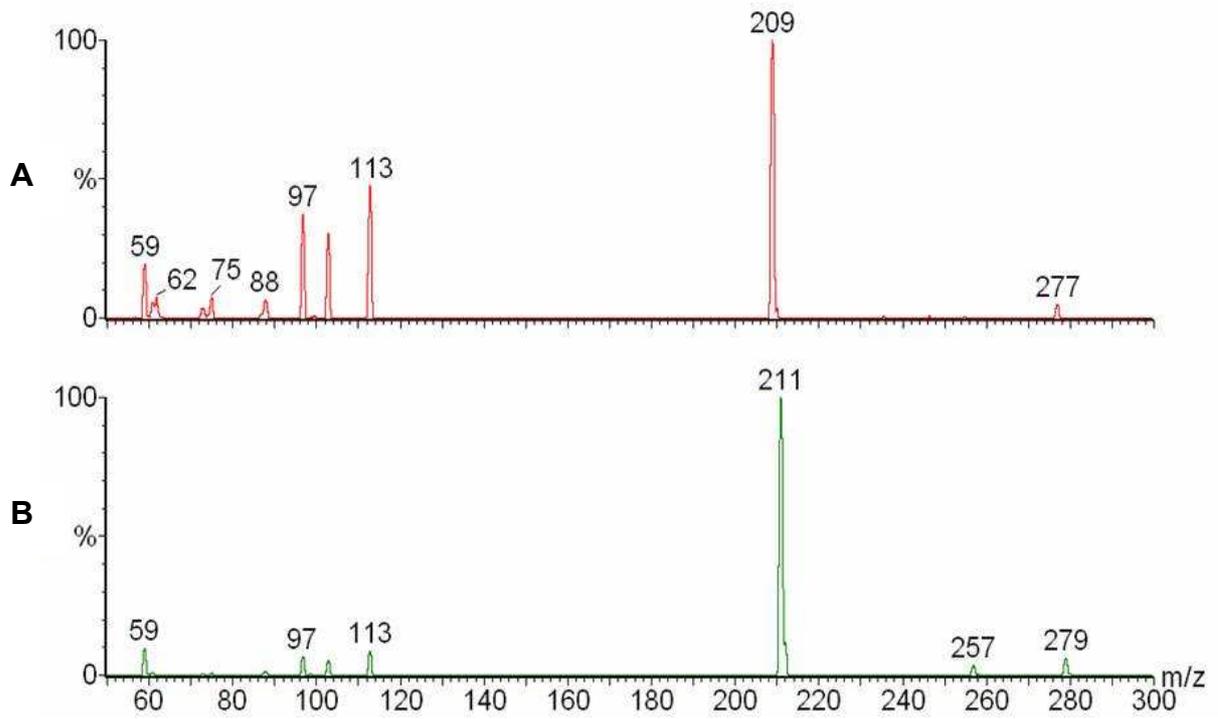
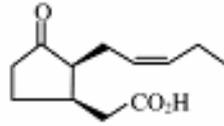
Figura 14: Atividade de LOX em resposta à herbivoria causada por *S. Frugiperda* (A) causada por *A. vanillae vanillae* (B), após 24 horas e 48 horas de exposição. C: folhas de plantas controle; H: folhas com sinais de herbivoria; HS: folhas sistêmicas de plantas atacadas. Valores de significância, para \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,005$  de acordo com teste *t*.



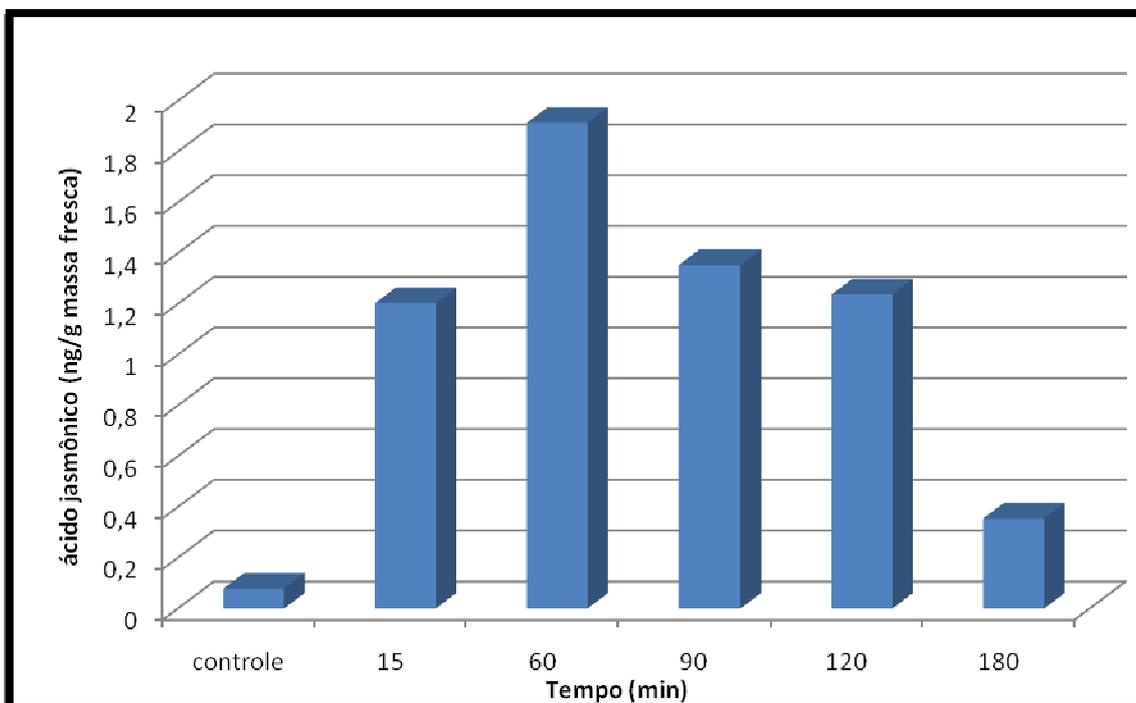
**Figura 15: Análise eletroforética por SDS-PAGE (10%)** C: extrato bruto das folhas controle; H: extrato bruto das folhas submetidas a herbivoria por *A. vanillae vanillae*; HS: extrato bruto das folhas de folhas sistêmicas de plantas atacadas.



**Figura 16: Análise do soro imune e pré-imune contra proteína LOX de maracujá** por *Western Blot* de proteínas da LOX de maracujá. Amostras protéicas (35  $\mu\text{g}$ ) de maracujá foram separadas por SDS-PAGE (10%) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Todas as proteínas utilizadas nesse experimento advieram de plantas do grupo controle. Os anticorpos contra LOX foram diluídos 1: 9000. As setas indicam reações inespecíficos dos soros com proteínas das folhas de maracujá.



**Figura 17: Espectro de massas. A) ácido jasmônico B) ácido jasmônico hidrogenado**



**Figura 18: Análise do ácido jasmônico endógeno de folhas controle e folhas feridas mecanicamente.** As barras verticais representam os níveis de ácido jasmônico (eixo y) em função do tempo (eixo x). As amostras foram analisadas por CLAE/EM-EM.

## 5. DISCUSSÃO

Os insetos herbívoros são responsáveis por grandes perdas na agricultura, por causarem injúrias, além de se alimentarem dos tecidos de plantas. As perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque desses insetos chegam a 13% das colheitas (Gatehouse *et al.*, 2002). A co-evolução das plantas resultou em uma seleção entre aquelas que paralelamente conviveram com insetos herbívoros. Uma das conseqüências foi o aprimoramento do mecanismo de defesa, seja constitutivo, ou a indução de proteínas que afetam negativamente a alimentação, crescimento, reprodução e ataque dessas pestes. Entre as proteínas, estão incluídas enzimas tais como as quitinases, as lectinas e os inibidores de enzimas digestivas (Ryan, 1990).

A busca de genes de defesa que são responsáveis pela síntese de proteínas de defesa tem se mostrado de enorme interesse da comunidade científica. Em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa identificou uma 13-LOX localizada em cloroplastos de maracujá que é induzida por ferida e vapores de MJ (Rangel *et al.*, 2002). Seguindo os moldes dos tratamentos utilizados anteriormente foi identificada uma aleno óxido sintase cloroplasmática de maracujá, enzima responsável pela primeira reação específica de ácido jasmônico. Subseqüentemente Botelho-Júnior e colaboradores em 2008, mostraram o acúmulo de inibidores de tripsina em folhas de maracujá após tratamento com MJ e herbivoria. A partir desses trabalhos se faz importante o estudo do acúmulo de transcritos LOX e sua atividade enzimática em resposta tratamentos como metil jasmonato, ferimento mecânico e herbivoria causada por um insetos especialista (*A. vanillae vanillae*) e um inseto generalista (*S. frugiperda*).

### 5.1 CLONAGEM DE UM FRAGMENTO DE cDNA DA LIPOXIGENASE DE MARACUJÁ

A inserção do oxigênio molecular na estrutura lipídica da membrana pela LOX constitui o primeiro passo para a síntese de ácido jasmônico e ativação de genes de defesa. Analisando dados anteriores, nosso grupo demonstrou que a LOX em tecido foliar de maracujá era fortemente induzida após 12 horas de tratamento com metil jasmonato (Rangel *et al.*, 2002). Baseando-se nestes

dados, RNA totais de plantas tratadas com metil jasmonato por um período de 12 horas foram utilizados em experimentos de RT-PCR. Com esse período de exposição ao metil jasmonato supomos que ocorreria um aumento dos níveis de lipoxigenase, facilitando a amplificação do fragmento de cDNA dessa proteína via experimento de RT-PCR. Além disso, utilizamos iniciadores degenerados produzidos a partir de uma seqüência conservada de nove aminoácidos (HAAVNFGQY), próximos à região C-terminal de várias LOX vegetais (Heitz *et al.*, 1997). Inicialmente utilizamos várias temperaturas de anelamento, mas só conseguimos amplificar um fragmento de tamanho esperado nas reações de RT-PCR (Figura 7) quando utilizamos uma temperatura baixa (45 °C) para o anelamento dos iniciadores. A amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb estão de acordo com dados da literatura, que mostram que com a utilização dos mesmos iniciadores foi possível a amplificação do fragmento obtido em reações de RT-PCR utilizando como molde RNA total extraído de folhas de tomate tratadas com metil jasmonatos por 24 horas (Heitz *et al.*, 1997). A baixa temperatura de anelamento pode ser consequência da utilização de um iniciador degenerado para a seqüência consenso da LOX, o que provavelmente dificultava o anelamento com temperaturas mais elevadas. A partir do fragmento amplificado por PCR, reamplificações seguintes foram realizadas com sucesso, já que as extremidades do cDNA já estavam definidas com o par de iniciadores utilizados na primeira reação de PCR. O fragmento foi clonado em vetor específico, os recombinantes foram selecionados e o fragmento novamente liberado com auxílio da enzima de restrição *Eco RI* (Figura 8).

Como o fragmento amplificado representa aproximadamente 25% do cDNA completo da LOX, uma vez que o tamanho final esperado é de aproximadamente 2,5 Kb, as nossas análises quanto a similaridade entre a seqüência de aminoácidos deduzidos do fragmento de cDNA, com seqüências de outras lipoxigenases vegetais são preliminares.

A análise parcial da seqüência deste fragmento revelou similaridade com outras LOX vegetais conhecidas. A dedução da seqüência parcial de aminoácidos da LOX de maracujá demonstrou similaridade com TomLOXC de tomate (67%) (Heitz *et al.*, 1997), LOX -H1 de batata (66%) (Royo *et al.*, 1999), *AtLox2* de *Arabidopsis thaliana* (62%) (Bell e Mullet, 1993) e LOX de arroz

(53%) (Peng *et al.*, 1994) (Figura 10). Nesse contexto, focamos em identificar padrões de cinética do acúmulo da LOX sob tratamentos específicos utilizando o fragmento amplificado como sonda marcada radiotivamente para experimentos de *Northern Blot*.

## 5.2 ANÁLISE DA CINÉTICA DO ACÚMULO DO RNAm DE LOX

O acúmulo da LOX em folhas de maracujá, em função do tempo, foi realizada utilizando três tipos de tratamentos diferentes: exposição aos vapores de MJ, folhas feridas e herbivoria por insetos (especialista e generalista). Segundo a literatura, as LOXs vegetais envolvidas na indução da resposta de defesa via a rota do octadecanóide são codificados por genes de ativação rápida ou precoce, quando comparados com genes que codificam proteínas de defesa que atuam diretamente contra os predadores (Ryan, 2000).

A capacidade do MJ em induzir inibidores de proteases em tomate (*Solanum lycopersicum*) é descrita desde 1990 (Farmer e Ryan, 1990); pesquisas sobre a indução de LOX gerando inibidores de proteases correlacionado com genes de defesa se seguiram utilizando plantas transgênicas com depleção da síntese de LOX ou sua superexpressão (Bellet *et al.*, 1995; Rance *et al.*, 1998; Kessler e Baldwin, 2003; Glazebrook, 2005) corroborando a importância da LOX na síntese de inibidores de proteases. Em nossos experimentos utilizando folhas de maracujá, observamos um aumento de RNAm de LOX após 3 horas de exposição ao metil jasmonato. Este resultado sugere que a ativação do gene que codifica a LOX em maracujá ocorre mais lentamente do que a resposta observada em plantas de tomate (Heitz *et al.*, 1997). Um padrão de resposta mais tardia já foi descrito para *Solanum tuberosum* e *Phaseolus vulgaris* onde seus transcritos de LOX foram detectados em tecido foliar a partir de 6 horas de exposição ao metil jasmonato (Fidantsef e Bostock., 1998; Porta *et al.*, 1999). O acúmulo dos transcritos do gene TomLOXD pode ser observado 30 minutos após a exposição de metil jasmonato, enquanto os transcritos do gene que codifica um inibidor de proteinase serínica é observado a partir das 3 horas (Heitz *et al.*, 1997).

Demonstramos uma cinética válida para a proposta apresentada, onde incluímos a transcrição do gene da LOX em resposta a indução com metil jasmonato e o gradual acúmulo de mRNA de LOX em resposta a indução com

tempos crescentes, observado entre os tempos de 3 horas e 24 horas após o início da exposição ao metil jasmonato (Figura 11); corroborando os dados anteriores do nosso grupo onde a atividade de LOX e o acúmulo da proteína foi fortemente induzido pelo metil jasmonato (Rangel *et al.*, 2002). Analisando a cinética do acúmulo da LOX de maracujá podemos correlacionar com a cinética de TomLOXD (Heitz *et al.*, 1997), AtLOX2 (Bell e Mullet, 1993), LOX1 (Melan *et al.*, 1993), PvLOX2 (Porta *et al.*, 1999) como responsivos ao metil jasmonato.

A maioria dos genes LOX é responsiva à indução para o metil jasmonato, mas o mesmo não é observado quando analisamos o estímulo por ferida. Algumas isoformas não são detectadas em experimentos onde plantas são feridas mecanicamente como é o caso da TomLOXC de tomate (Heitz *et al.*, 1997), LOX1 de *Arabidopsis* (Reymond *et al.*, 2000). Em contrapartida, vários genes LOX foram identificados como responsáveis a ferida mecânica como é o caso das LOX de maracujá (Rangel *et al.*, 2002), PdLOX2 (Cheng *et al.*, 2006), LOXH1 e LOXH3 de batata (Farmaki *et al.*, 2007), e PvLOX6 (Porta e Fegueroa-Balderas, 2008). Em nossos experimentos utilizando ferida mecânica como processo de indução observamos um acúmulo de transcritos de LOX após 1,5 hora do início dos ferimentos, este acúmulo permaneceu constante até 9 horas após o ferimento mostrando a máxima indução 12 horas após o ferimento; bem como nas folhas contíguas não feridas (Figura 11); esses resultados demonstram que o gene LOX de maracujá também é responsivo ao tratamento com ferida mecânica.

Entre outros mecanismos de indução da LOX em vegetais o uso de espécies de insetos herbívoros e patógenos vêm sendo utilizados largamente durante os anos de estudo das funções da LOX para ativar mecanismos de defesa. A evidência de que mecanismos de ativação de genes de defesa seriam ativados através do estímulo de insetos herbívoros foi inicialmente proposto por Ryan em 1990, deste então experimentos subseqüentes corroboraram essa hipótese inicial. Contudo, pesquisas apontam que somente alguns genes de defesa podem ser ativados por injúria mecânica e herbivoria (Howe e Jander, 2008; Stratman e Ryan, 1997; Baldwin, 1998), outros genes somente são ativados após herbivoria por insetos (Korth e Dixon, 1997; Reymond *et al.*, 2000). Aliado a essas observações, trabalhos demonstram que a deficiência do gene LOX, em alguns transgênicos, reduz significativamente a

defesa vegetal contra insetos herbívoros (Halitscheke e Baldwin, 2003; Nemchenko *et al.*, 2006). Botelho-Júnior e colaboradores (2008) demonstraram que larvas de *A. vanillae vanillae* ativam o mecanismo de defesa vegetal, gerando um acúmulo de inibidores de tripsina. Partindo desses conhecimentos, foram realizados experimentos a fim de estabelecer correlação entre o funcionamento de LOX de maracujá e os processos de defesa vegetal. Utilizando dois modelos distintos, um com larvas de insetos generalistas e outro com larvas especialista, demonstramos a expressão de LOX em folhas atacadas por essas larvas herbívoras e folhas sistêmicas (Figura 12). Quando comparamos a expressão em folhas feridas pudemos notar um maior acúmulo de LOX do que aquelas sistêmicas. Em folhas feridas mecanicamente a indução de LOX foi menor do que em plantas submetidas a herbivoria, fato igualmente descrito em *Arabidopsis thaliana* (Reymond *et al.*, 2000, 2004) e em algodão (Páre e Tumlinson, 1997), o que nos leva a crer que as secreções orais desses insetos estão diretamente ligadas à expressão do gene LOX em maracujá, fato demonstrando em tabaco (Kahl *et al.*, 2000; Hummel, 2009).

### **5.3 INDUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LOX POR HERBIVORIA**

Analisamos a atividade de LOX seguindo modelo de herbivoria causado pelas larvas dos insetos generalistas e especialistas em períodos de 24 e 48 horas (Figura 13). A observação do grupo controle (folhas de plantas intactas) nos mostra o nível basal de LOX que a planta produz para manutenção de estados fisiológicos em homeostase. Em contrapartida a atividade de LOX aumenta consideravelmente quando submetidas as herbivorias, mesmo em folhas sistêmicas (folhas intactas de plantas submetidas à herbivoria) sugerindo um modelo de sinalização distal descrito anteriormente por Rangel e colaboradores em 2002. Quando analisamos a reprodutibilidade do ensaio encontramos alguns problemas resultantes dos ensaios *in vivo*. O padrão de alimentação e voracidade das lagartas é imprevisível, acarretando em desvio-padrão alto.

Os dados demonstram uma atividade análoga de LOX em resposta a ambos os insetos, corroborado pelos resultados utilizando *Arabidopsis thaliana*

como planta modelo (Reymond *et al.*, 2004) no qual experimentos de micro arranjos demonstram uma alta similaridade entre expressões gênicas de plantas submetidas a larvas de insetos especialistas e generalistas.

Visando estudar a LOX induzida em folhas de maracujá em experimentos de *Western Blot* foram produzidos anticorpos policlonais em coelhos contra a LOX de maracujá. Entretanto os anticorpos produzidos se mostraram inespecíficos para a proteína LOX (Figura 15), ocasionando marcação de várias regiões da membrana.

#### **5.4 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO**

Como descrito anteriormente, o ácido jasmônico é o produto da Rota do Octecanóide relacionado com defesa vegetal, sendo a LOX a primeira enzima dessa cascata. Por isso fez-se necessário a investigação e a correlação do acúmulo de LOX e a dosagem de ácido jasmônico endógeno. A lipoxigenase é a primeira enzima para a síntese de ácido jasmônico ao final da Rota do Octadecnóide. Assim, podemos relacionar a dosagem de ácido jasmônico endógeno (Figura 17) com o acúmulo de LOX em folhas feridas (Figura 11). Porém essa avaliação não poderá ser discutida, pois, a priori, estava prevista a dosagem do produto da aleno óxido sintase e o precursor direto do ácido jasmônico, o OPDA; bem como o metil jasmonato endógeno, bem como repetições com outros grupos de plantas. Essas correlações poderiam nos trazer informações valiosas quanto ao paralelo de síntese entre a lipoxigenase e o ácido jasmônico. Rakwal e colaboradores em 2002 demonstraram que os níveis de ácido jasmônico são dependentes da produção de OPDA apenas nos primeiros 15 minutos da indução por ferida mecânica e após esse período os níveis de ácido jasmônico continuam crescendo até 30 minutos. Em trabalho posterior, o uso de plantas transgênicas com redução nos níveis de monogalactosildiacilglicerol (MGDG), eliciadores da Rota do Octadecanóide, demonstrou que a dosagem de ácido jasmônico era consideravelmente reduzida quando plantas eram feridas mecanicamente (Wang, 2009).

Os métodos utilizados para análise quantitativa de ácido jasmônico, e os compostos relacionados, em plantas possui um alto nível de sensibilidade,

requerendo processos de purificação trabalhosos e específicos. O objetivo do nosso grupo de pesquisa é o aprofundamento das metodologias químicas referentes a esses processos.

## 6. Conclusões

- Um fragmento de cDNA da lipoxigenase de aproximadamente 700 pb foi amplificado via RT-PCR e clonado em vetor plasmidial. Esse fragmento foi utilizado como sonda para estudo da expressão do gene LOX sob diferentes tratamentos.
- O trecho analisado do cDNA de LOX apresenta similaridade com outras lipoxigenases de vegetais.
- O gene da LOX de maracujá é responsivo ao tratamento por metil jasmonato, ferida mecânica e herbivoria. Sendo o maior acúmulo de transcritos em resposta a metil jasmonato. As induções por herbivoria resultaram em um acúmulo maior do que aquelas feridas mecanicamente.
- Larvas de insetos generalistas e especialistas induzem níveis semelhantes de atividade enzimática de LOX; indicando a ação herbívora como um dos mecanismos da ativação das Vias das Lipoxigenases.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ACOSTA I. F., LAPARRA H., ROMERO S. P., SCHMELZ E., HAMBERG M., MOTTINGER J. H., MORENO M.A. E DELLAPORTA. S. L. (2009) Tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize *Science*. 323, 262-265.

AGRAWAL, G. K., SHIGERU, T., HAN, O., IWAHASHI, H. E RAKWAL, R. (2004) Rice octadecanoid pathway. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 317, 1-15.

AGRIBUS (2008) Anuário Estatístico de Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 393-399.

AIMURA, G., KOST, C. E BOLAND, W. (2005) Herbivore-induced, indirect plant defence. *Biochim et Biophys Acta*, 1734, 91-111.

ANANTHAKRISHNAN, T. N. (1999) Induced responses, signal diversity and plant defense: implications in insect phytophagy. *Curr. Sci.* 76, 285-290.

ANDEF - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL (2007) Perdas na agricultura ocasionadas por insetos, doenças e plantas invasoras. *Boletim Informativo*, 62, 5-12.

ANDERSON, J. M., SPILATRO, S. R., KLAVER, S. F. E FRANCESCHI, V. R. (1989) Jasmonic acid-dependent increase in level of vegetative storage protein in soybean. *Plant Sci.* 62, 45-52.

ANDREOU, A., HORNUNG, E., KUNZE, S., ROSAHL, S. E FEUSSENER, I. (2008). On the Substrate Binding of Linoleate 9-Lipoxygenases. *Lipids*. 44 (3), 867 – 875.

ANDREOU, A. E FEUSSNER, I. (2009). Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*. 70 (13), 1504-1510.

ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE FRUTOS TROPICAIS–ASTN. (2005) Produção Nacional de Polpas e Destino.

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.

BARROS, T. S. L. (1999) Fitoplasma no Brasil: caracterização molecular via PCR e RFLP. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.

BATE, N. J. E ROTHSTEIN, S. J. (1998) C6 volatiles derived from lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.* 16, 561-569.

BATISTA, F. A. S., GOMES, R. C. E RAMOS, V. F. (2001) Ocorrência de uma anomalia de causa virótica, provocando enfezamento do maracujazeiro. *In: Congresso Brasileiro de Fruticultura. Anais.* 19, 1408-1431.

BELL, E. E MULLET, J. E. (1991). Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.* 230, 456-462.

BELL, E. E MULLET, J. E. (1993) Characterization of *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* 103, 1133.

BELL, E., CREELMAN, R. A. E 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 pathways. *Trends Plant Sci.* 1, 233-240.

BERNACCI, L. C. (2008) Passifloraceae. *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo.* 3, 247-248.

BLÉE, E. (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid. Res.* 37, 33-72.

BLÉE, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7, 315-322.

BOIÇA JR. (1998). Pragas da cultura do maracujazeiro. *In*: Simpósio sobre a cultura do maracujazeiro, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: FUNEP. 175-203

BOLTER, C. J. (1993) Methyl Jasmonate induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. *Plant Physiol.* 103, 1347-1353.

BOTELHO-JÚNIOR, S., SIQUEIRA-JÚNIOR, C.L., JARDIM, B.C., MACHADO, O.L.T., NEVES-FERREIRA, A.G.C., PERALES, J. E JACINTO, T. (2008). Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: Accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9404-9409.

BRADBURY, D. M. (1986). Doenças de passifloras silvestres y cultivadas en zonas altas de los estados Aragua y Miranda. Región centro-norte de Venezuela. *Plant Gen. New. Res.* 125, 9-15.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of proteins utilizing the principle of protein-dye binding (1976) *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

BRAIOT, E., VIANELLO, A., PETRUSSA, E. E MACRI, F. (1993) Dissipation of eletrichemical proton gradient in phospholipase-induced degradation of plant mitochondria and microsome. *Plant Sci.* 90, 31-39.

BRUCKNER, C. H. E. E PIKANÇO, M. C. (2001) Maracujá – Tecnologia de produção, Pós-colheita, Agroindústria, Mercado. Editora Cinco Continentes. Porto Alegre-RS.

BUHOT, N., DOULIEZ, J. P., JACQUEMARD, A., MARION, D., TRAN, V., MAUME, F. (2004) .A lipid transfer protein bind receptor involved in the control plant defence responses. *FEBS Lett.* 509, 27–30.

CACAS, J., MARMEY, P., MONTILLET , J., SAYEGH-ALHAMDIA, M. , JALLOUL, A., ROJAS-MENDOZA, A., CLÉRIVE, A. E NICOLE, M. (2008). A novel patatin-like protein from cotton plant, GhPat1, is co-expressed with GhLox1 during *Xanthomonas campestris*-mediated hypersensitive cell death *Biotic and Abiotic Stress.* 25, 569-575.

CHAGAS, C. M. (1993). Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil. *A cultura do maracujazeiro no Brasil*. Jaboticabal: FUNEP, 175-186.

CHENG, Q., ZHANG, B., ZHUGE, Q., ZENG, Y., WANG, M. E HUANG, M. (2006). Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in *Populus deltoids*. *Plant Sci*. 170, 1027-1035.

CHRISTOFOLETTI, J. C. (2006) Novas pontas de pulverização para dessecação e para o controle de doenças em soja. *Manual Técnico de Aplicação de Defensivos Agrícolas* 53-61.

COLARICCIO, A., LOVISOLO, O., CHAGAS, C. M., GALLETI, S. R., ROSETTI, V. E KITAJIMA, E. W. (1995). Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. *Fitopatol. Bras.* 20, 208-213.

CREELMAN, R. A. E MULLET, J. E. (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 4114-4119.

CREELMAN, R. A. E MULLET, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48, 355-381.

CUNHA, M. A. P., BARBOSA, L. V. E FARIA, G. A. (2004) Maracujá: produção e qualidade de passicultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA 325 – 343.

DEGENHARDT, J. (2009) Indirect Defense Responses to Herbivory in Grasses. *Plant Physiol.* 149, 96-102.

DEVRIES, P. J. (1987). The butterflies of Costa Rica and their natural history: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. *Princeton, Princeton University*. 327-383.

DICKE, M., VAN LOON, J. J. A., JONG, P. W. (2004) Ecogenomics benefits community ecology. *Science*. 3005, 618-619.

EDWARDS, P .J. E WRATTEN, S. D. (1981) Ecologia das interações entre insetos e plantas. *EPU/EDUSP.* , São Paulo, 71-76.

FADINI, M. A. M., LEMOS, W. P., PALLINI, A., VENZON, M. E MOURÃO, S. A. (2004) Herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) induz defesa direta em morangueiro? *Neotropical Entomology*. 33, 293-297.

FALEIRO, F. G., ROSA, N. T. V. E BRAGA, M. F. (2005) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético . EMBRAPA Cerrados. 81-108.

FANCELLI, M. (1998). Maracujá em foco: as lagartas desfolhadoras do maracujazeiro. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 3, 1-5.

FARMAKI, T., SANMARTÍN, M., JIMÉNEZ, P., PANEQUE, M., SANZ, C., GUY, V., LEON, J. E SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. (2007) Differential distribution of lipoxygenase pathway enzymes with potato chloroplasts. *J. Expe. Bot.* 58 (3), 555-568.

FARMER, E. E. E RYAN, C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 7713-7716.

FARMER, E. E. E RYAN, C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*. 4, 129-134.

FELTON, G. W. (2006) Indigestion is a plant's best defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18771-18772.

FEUSSNER, I., HAUSE, B., VÖRÖS, K., PARTHIER, B., E WASTERACK, C. (1995). Jasmonate-induced lipoxygenases forms are localized in chloroplast of barley leaves (*Hordeum vulgares* cv. Salome). *Plant J.* 7, 949-958.

FEUSSNER, I., HAUSE, B., VOROS, K., PARTHIER, B. E WASTERACK C. (1995) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv Salome). *Plant J.* 7, 949-957.

FEUSSNER, I., KÜHN, H. E WASTERACK, C. (2001) The lipoxygenase dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant. Sci.* 6, 268-273.

FEUSSNER, I. E WASTERNAK, C. The Lipoxygenase Pathway. (2002). *Annu Rev Plant Biol.* 53, 275-297.

FISCHER, A. M., DUBBS, W. E., BAKER, R. A., FULLER, M. A., STEPHENSON, L. C. E GRIMES, H. D. (1999) Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenase indicate distinct functional role for individual isoforms. *Plant J.* 19, 543-554.

FROELICH, J. E., ITHOH, A., E 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.

GAQUEREL, E., HERVÉ C., LABRIÈRE, C., BOYEN, C., POTIN, P. E SALAÜN, J. P. (2007) Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyljasmonate. *Bioch. et Bioph. Acta* 1771, 565–575.

GATEHOUSE, J. A. (2002) Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol.* 156, 145-169.

GEHARDT, B., FISCHER, K., BALKENHOHL, T. J., POHENERT, G., KÜHN, H., WASTERNAK, C. (2005) Lipoxygenase-mediated metabolism of storage lipids in germinating sunflower cotyledons and  $\beta$ -oxidation of (9Z, 11E, 13S)-13-hydroxy-octadeca-9, 11-dienoic acid by the cotyledonary glyoxysomes. *Planta.* 220, 919-930.

GHENG, Q., ZAHUGE, Q., ZENG, Y., WANG, M. E HUANG, M. (2006) Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in *Populus deltoides*. *Plant Science* 170,1027-1035.

GLAZEBROOK, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 43, 205-207.

GRIFFITHS, A., BARRY, C., ALPUCHE-SOLIS, A. G. E GRIERSON, D. (1999) Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 50, 793-798.

GRIMES, H. D., KOETJE D. S. E FRANCHESCHI, V. R. (1995) Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-induced lipoxygenase in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 100, 433-443.

GUINI, R. E BETTIOL, W (2000) Proteção de plantas na agricultura sustentável. *Caderno de Ciências e tecnologia.* 17, 61-70.

HALITSCHKE, R. E BALDWIN, I. T. (2005) Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *J. Plant Growth Regul.* 23, 238–245.

HEITZ, T., BERGEY, D. R. E 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.

HEPPNER, J. B. (2004) Atlas of Neotropical Lepidoptera. *Ass. for Trop. Lep.* 5, 428.

HOWE, G. (2004). Jasmonate as signal in the wound response. *J Plant Growth Regul.* 23, 223-237.

HOWE, G.A., JANDER, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol.* 59, 41-66.

[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

<http://www.expasy.org>

HUMMEL, G. M., SCHURR, U., BALDWIN, I. T. E WALTER, A. (2009) Herbivore-induced jasmonic acid bursts in leaves of *Nicotiana attenuata* mediate short-term reductions in root growth. *Plant, Cell & Envir.* 2 (10), 134 – 143.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E PESQUISA (2008) Produção Agrícola. Maracujá. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. (1994) MARACUJÁ. Série Frutas Tropicais. Nº 9. Segunda Edição. Campinas. 89.

ISHIGURO, S., KAWAI-ODA, A., UEDA, J., NISHIDA, I. E OKADA, K. (2001). The defective in anther dehiscence 1 gene encodes a novel catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 13, 2191-2209.

ITOH, A. E HOWE, G. A. (2001) Molecular cloning of divinyl ether synthase: identification as a CYP74 cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 276, 3620-3627.

JACINTO, T. FERNANDES, K. V. S., MACAHADO, O. L. T. E SIQUEIRA – JÚNIOR, C. L. (1998) Leaves of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin accumulate high levels of cystatin. *Plant Sci.* 138, 35-42.

KADER, J. C., (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 627-654.

KAHL, J., SIEMENS, D. H., AERTS, R. J., GÄBLER, R. E KUHNEMANN (2000). Herbivore-induced ethylene suppresses a direct but not a putative indirect defense against herbivore. *Planta*. 210, 336-342.

KAZAN, K. E MANNERS, J. M. (2008) Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol.* 146, 1459-1468.

KOLOMIETS, M. V., CHEN, H., GLADON, R. J., BRAUN, E.J., E HANNAPEL, D. J. (2000) A Leaf Lipoxygenase of Potato Induced Specifically by Pathogen Infection *Plant Physiol.* 124, 1121-1130 .

KOLOMIETS, M. V., HANNAPEL, D. J., CHEN, H., TYMENSON, M. E GLADON, R. J. (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13, 613-623.

KORTH, K. L. E DIXON, R. A. (1997). Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiology*, 115:1299-1305.

LAEMMLI, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*. 227, 680-685.

LEE, D. S., NIOCHE, P., HAMBERG, M. E RAMAN, C. S. (2008) Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature*. 455, 363-370.

LEON, J., ROJO, E. E SÁNCHEZ-SERANO, J. J. (2001) Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52, 9-18.

LEONE, A., MELILLO, M. T. E BLEVE-ZACHEO, T. (2001). Lipoxigenase in pea roots subjected to biotic stress. *Plant Sci.* 161, 703-717.

LI, C., SCHILMILLER, A. L., LIU, G., LEE, G., JAYANTY, S., SAGEMAN, C., VREBALOV, J., GIOVANNONI, J. J., YAGI, K. E HOWE, G. A. (2005) Role of b-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell*. 17, 971-986.

LI, L., LI, C., LEE, G. E HOWER, G. A. (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 6416–6421.

LIBERATO, JR. E COSTA, H. (2001). Doenças fúngicas, bacterianas e fitonematóides. *Cultura do maracujá*. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre, RS. 243-284.

LUCAS, P. W., TURNER, I. M., DOMINY, N. J. E YAMASHITA, N. Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany*, 86, 913-920.

MAARA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA (1996) FRUPEX Maracujá para exportação – *Aspectos Técnicos da Produção*.

MAARA/EMBRAPA/CNPMF (1994) Instruções Práticas Para o Cultivo do Maracujazeiro Circular Técnica. 20, 34-42.

MATSUI, K., UJITA, C., FUJIMOTO, S., WILKINSON, J .E HIATT, B. (2000) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber. *FEBES Lett.* 481, 183-188.

MATSUI, K., WILKINSON, J., HIATT, B., KNAUF, V. E. E KAJIWARA, T. (1999) Molecular cloning and expression of *Arabidopsis* fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Cell Physiol.* 40, 477-481.

MAZOYER, M. (2003) Desigualdades agrícolas e alimentares no mundo: causas e conseqüências. *Acta Social.* 2, 4-6.

MCCONN, M., CREELMAN, R.A., BELL, E., MULLET, J.E. E BROWSE, J., (1997) Jasmonate plays an essential role in plant insect defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5473–5477.

MCGURL, B., PEARCE, G., OROZCO-CARDENAS, M. E RYAN, C.A. (1992) Structure, expression and antisense inhibition of systemin precursor gene. *Science* 255, 1570-1573.

MEI, G., VENERE, A. D., NICOLAI, E., ANGELUCCI, C. B., IVANOV, I., SABATUCCI, A., DAINESE E., KUHN, H., E MACCARRONE, M. (2008) Structural Properties of Plant and Mammalian Lipoxygenases. Temperature-Dependent Conformational Alterations and Membrane Binding Ability *Biochemistry* 47, 9234–9242.

MELAN, M. A., DONG, X., ENDARA, M. E., DVIS, K. R., AUSUBEL F. M. E PETERMAN, T. K. (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 99, 220-228.

MELETTI, L. M., SOARES-SCOTT, M. D., PINTO-MAGLIO, C. A. E MARTINS C. A. F. (1994) Caracterização de Germoplasma de Maracujazeiro (*Passiflora* sp) *Ver. Brás. Frut.* 14, 157-162.

MICHENER, C. D. (1942) A review of the subspecies of *Agraulis vanillae* (Linnaeus). *Lepidoptera: Nymphalidae. Ame. Mus. Nov.* 1215, 1-7.

MIERSCH, O. E WASTERACK, C. (2000) Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biol. Chem.* 381, 715–22.

MOFFAT, A.S. (2001) Finding new ways to fight plant diseases. *Science*. 2251, 35-39.

MYUNG, K., HAMILTON-KEMP, T.R. E ARCHBOLD, D.D. (2006) Biosynthesis of trans-2-Hexenal in response to wounding in strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem* . 54, 1442-1448.

NEMCHENKO, A., KUNZE, S., FEUSSNER, I. E KOLOMIETS, M. (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments *J. Exp. Bot.* 57(14), 3767-3779.

NEMHAUSER, J. L. (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467-475.

NIELSEN, K. E BOSTON, R. S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 52, 783-792.

NOORDERMEER, M. A., VELDINK, G. A. E VLIEGENTHART J. F. G. (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chem. Bio.* 2, 494-504.

OLIVEIRA, C. R. B., MARINHO, V. L. A., ASTOFOLI F., AZEVEDO, M., CHAGAS, C. M. E KITAJIMA, E. W. (1994) Purification, serology and some properties of purple granadilla (*Passiflora edulis*) mosaic virus. *Fitopatologia Brasileira*. 19, 455-462.

OLIVEIRA, J. A., JUNQUEIRA, N. T. V., PEIXOTO, J. R. E PEREIRA, A. V. (2002). Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento de estacas de maracujazeiro-azedo (*passiflora edulis* Sims) *Rev. Bras. Frut.* 24(2), 505-508.

PARÉ, P. W. E TUMLINSON, J. H. (1997) De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiol.* 114, 1161-1167.

PARKER, C. W. (1987) Lipid mediators produced through the lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Immunol.* 5, 65 – 63.

PARTHIER, B. (1990). Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *Plant Growth Regul.* 9, 57 – 63.

PAUWELS, L., INZÉ, D. E GOOSSENS, A. (2009) Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Sci.* 14(2), 87-91.

PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S. E RYAN C. A. (1991) A polypeptide from tomato leaves activates the expression of proteinase inhibitor genes. *Science.* 253, 895 - 897.

PEETERS, P. J. (2002) Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insects guilds. *Biological Journal of the Linnean Society.* 43, 65-77.

PEÑA-CORTES, H., SANCHEZ-SERRANO J. J., MERTENS R., WILLMITZER L. E PRAT, S. (1989) Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 86, 9851-9855.

PENG, Y.L., SHIRANO Y., OHTA H., HIBINO T., TANAKA K. E SHIBATA D. (1994) A novel LOX from rice-primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J. Biol. Chem.* 269, 3755-3761.

PIO-RIBEIRO, G. E MARIANO, L. R. (1997) Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). *Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas.* 2, 37-45.

PORTA, H. E ROCHA-SOSA, M. (2002) Plant lipoxygenase. Physical and molecular features. *Plant Physiol.* 130, 15-21.

PORTA, H., FIGUEIROA-BALDERAS, R. E. E ROCHA-SOSA, M. (2008). Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 227, 363-373.

PORTA, H., RUEDA-BENÍTEZ, P., CAMPOS, F., COLMENERO-FLORES, J. M., COLORADO, J. M., CARMONA, M. J., COVARRUBIAS, A. A. E ROCHA-SOSA, M. (1999) Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 40, 850-858.

RAKWAL, R., TAMOGAMI, S., AGRAWAL, G. K. e IWAHASHI, H. (2002) Octadecanoid signaling component “burst” in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungul elicitor chitosan. *Bioch. Biophys. Reach. Comm.* 295, 1041-1045

RANCÉ, I., FOURNIER, J. E. E ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 6554-6559.

RANGEL, M., MACHADO, L. T. O., CUNHA, M. E JACINTO, T. (2002) Accumulation of chloroplast-targetes lipogygenase in passion fruit in response to methyl jasmonato. *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.

REINBOTHE, C. E PARTHIER, R. (1997) Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. *Planta.* 201, 281-287.

REYMOND, P., BODENHAUSEN, N., VAN POECKE, R.M.P., KRISHNAMURTHY, V., DICKE, M. E FARMER, E.E. (2004) A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell.* 16, 3132-3147,.

REYMOND, P., WEBER, H., DAMOND, M. E FARMER, E.E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell* 12, 707-719.

RIZZI, L. C., RABELLO L. R., MOROSINI FILHO, W., SAVAZAKI, E. T. E KAVATI, R. (1998). *Cultura do maracujá azedo.* 2, 145-148.

ROYO, J., VANCANNEYT G., PEREZ A .G., SANZ C., STÖRMANN K., ROSAHL S. E SANCHEZ-SERRANO J. J. (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 271, 21012-21019.

ROYO, J., LÉON, J., VANCANNEYT, G., ALBAR, J. P., ROSAL, S., ORTEGO, F., CASTAÑERA, P. E SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. (1999). Antisense-mediated depletion of potato lipoxygenase reduces woud induction of proteinase inhibition 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. *Annual review of phytopa.* 28, 425-449.

RYAN, C. A. (2000) The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defense genes. *Biochem. Bioph. Acta.* 1477, 112-121.

RYAN, C. A. E FARMER, E. E. (1991) Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu Rev. Plant Physiol.* 42, 651-674.

RYAN, C. A., PEARCE, G., SCHEER, J. E MOURA, D. S. (2002) Polypeptide hormones. *Plant Cell.* 14: 251-264.

RYU S.B., WANG X. (2006), Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves, *Biochim. Biophys. Acta.* 1303, 243–250.

RYU, S. B. E WANG, X. (1995) Expression of Phospholipase D during Bean Leaf Senescence. *Plant Physiology.* 108, 713-719.

SAMBROOK, J., E RUSSEL, D. W. (2001). *In: Molecular cloning: a labaratory manual.* 3<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- SANTINO, A., IANNACONE, R., HUGHES, R., CASEY, R. E MITA, G. (2005) Cloning and characterisation of an almond 9-lipoxygenase expressed early during seed development. *Plant Sci* 168, 699-706.
- SANTOS, R.I. (2004) Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5, 403-434.
- SÃO JOSÉ, A. R. (1994). A cultura do maracujazeiro: prática de cultivo e mercado. Vitória da Conquista-BA, DFZ/UESB.
- SCHEER, J. M. E RYAN, C. A. (1999) A 160kd systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension cultured cells. *Plant Cell*. 11, 1525-1535.
- SCOLARI, D. D. G. (2007) Produção agrícola mundial: O potencial do Brasil. – Embrapa Roraima. Artigo Técnico: 1-42.
- SEO, H. S., SONG, J. T., CHEONG, J. J., LEE, Y. W., HWANG, I., LEE, J. S. E CHOI, Y. D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 98, 4788-4793.
- SHIBATA, D. E SLUSARENKO, A., CASEY, R., HILDEBRAND, D. E BELL, E. E. (1994). Lipoxygenases. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, 41-42.
- SIEDOW, J. N. (1991) Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual review of Plant Physiol*, 42, 145-188.
- SONG, W. C., FUNK, C. D. E BRASH, A. R. (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Pro. Natl. Acad. Sci USA*. 90, 8519-8523.
- SOUZA FILHO, M.F., RAGA, A. e ZUCCHI, R. A. (2000) Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. *Conhecimento básico e aplicado* 277-283.
- SOUZA, J. S. I. E MELETTI, L. M. M. (1997) Maracujá: espécies, variedades e cultivo. FEALQ. 179.

SOUZA, M. M., PALOMINO, G., PEREIRA, T. N. S., PEREIRA, M. G., VIANA, A. P. E SILVA, L. C. S. E SUDRÉ, C. P. (2003). Variação interespecífica do tamanho do genoma em *Passiflora* spp.. 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento Genético de Plantas. 297-302.

STENZEL. I, HAUSE. B, MAUCHER. H, PITZSCHKE. A, MIERSCH. O E ZIEGLER. J.(2003) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound-signalling. *Plant*. 33, 577–89.

STRATMANN, J. E RYAN, C.A. (1997) Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11085 - 11089.

SUZUKI, G., OTHA, H. KATO, T., IGARASHI, T. MASUDA, T. E TAKAMIYA, K. (1996). Induction of novel cytochrome P450 (CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension-culture cells. *FEBES Lett.* 383, 83-86.

THOMA, B. P. H. J., CAMMUE, B. P. A. E THEVISSSEN, K.(2002) Plant Defensins. *Planta*. 216, 193-202.

THOMAZINI, M. J. E THOMAZINI, A. P. B. W. (2000) A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas. *Embrapa Acre Documentos* 57, 21-29.

THOMMA, B. P., NELISSEN, I., EGGERMONT, K. E BROEKAERT, W. F. (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal* 19, 163-171.

TOWBIN, H., STAHELIN, T. E TURCKER, G. G. A. (1979) Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.

VAN DER BIEZEN, E. A. (2001) Quest for antimicrobial genes engineer disease resistant crops. *Trends Plant Sci*, 6, 89-9.

VANCE, R. E., HONG, S., GRONERT, K., SERHAN, C. N. & MEKALANOS, J. J. (2004). The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secreted arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 2135–2139.

VELLOSILLO, T., MARTÍNEZ, M., LÓPEZ, M. A., VICENTE, J., CASCÓN, T., DOLAN, L., HAMBERG, M. & CASTRESANA, C. (2007) Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in *Arabidopsis* Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade. *The Plant Cell*. 19, 831-846.

VICK, B. A. & ZIMMERMANN, D. C. (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 111, 470-477.

VICK, B.A. & ZIMMERMANN, D.C. (1987). Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. *Biochem Plants. Acad. Press*, New York, 53-90.

WALKER-SIMMONS, M. K. & RYAN C. A. (1984) Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves. Induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan and chitin. *Plant Physiol*. 76, 787-790.

WALKER-SIMMONS, M. K. & RYAN C. (1986). Proteinase Inhibitor I Accumulation in Tomato Suspension Cultures Induction by Plant and Fungal Cell Wall Fragments and an Extracellular Polysaccharide Secreted into the Medium. *Plant Physiol*. 80, 68–71.

WANG, J. (2009) Monogalactosyldiacylglycerol deficiency affects jasmonic acid biosynthesis and defense responses to insect herbivores in *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci*. 179, 279-285.

WASTERNAK, C. & PARTHIER, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci*. 2, 302-311.

WASTERNACK, C. JASMONATES. (2007) Na update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.* 100, 681-685.

WASTERNACK, C., MIERSCH, O., KRAMELL, R., HAUSE, B., WARD, J., BEALE, M., BOLAND, W., PARTHIER, B. E FEUSSNER, I. (1998) Jasmonic acid: biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Feet/Lipid.* 100, 139-146.

WELLESEN, K., DURS, T. F., PINOT, F., BENVENISTE, I., NETTESHEIM K., WISMAN, E., STEINER-LANGE, S., SAEDLER, H. E YEPHREMOV, A. (2001) Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid  $\omega$ -hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 9694–9699.

YAMAMURA, N. E TSUJI, N. (1995) Optimal strategy of plant antiherbivore defense: Implications for apparency and resource-availability theories. *Ecol. Res.* 10, 19-30.

YOKOYAMA, M., YAMAGUCHI, S., INOMATA, S., KOMATSU, K., YOSHIDA, S., IIDA, T., YOKOKAWA, Y., YAMAGUCHI, M., KAIHARA, S. E ATSUSHI, T. (2000) Stress-Induced Factor Involved in Flower Formation of *Lemna* is an  $\alpha$ -Ketol Derivative of Linolenic Acid. *Plant and Cell Physiol.* 41, 110-113.