

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/48967

IB/ 81816

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNICAMP

2001



**“Identificação de genes regulados por ácido jasmônico em
Arabidopsis thaliana: caracterização de dois genes homólogos às
proteínas ligantes de mirosinase”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Adriana Natalício
Capella
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de doutor em Genética e
Biologia Molecular, área de concentração
Genética Vegetal e Melhoramento.

Adriana Natalício Capella

Orientador: Dr. Paulo Arruda

Co-orientador: Dr. Celso Eduardo Benedetti

Campinas-SP
2001

UNIDADE	IB/81816
Nº CHAMADA	UNICAMP
	C17A
V	
48967	
16-837102	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/02
Nº CPD	

CM00167289-2

85 10 255774

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C17i

Capella, Adriana Natalício

Identificação de genes regulados por ácido jasmônico em *Arabidopsis thaliana*: caracterização de dois genes homólogos às proteínas ligantes de mirosinase/Adriana Natalício Capella.-- Campinas, S.P:[s.n.], 2001.

Orientador: Paulo Arruda

Co-Orientador: Celso Eduardo Benedetti

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1. *Arabidopsis thaliana*.
2. Ácido jasmônico.
3. Proteínas ligantes de mirosinase.
- I. Arruda, Paulo.
- II. Benedetti, Celso Eduardo.
- III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- IV. Título.

Campinas, 11 de dezembro de 2001.

Prof. Dr. Paulo Arruda



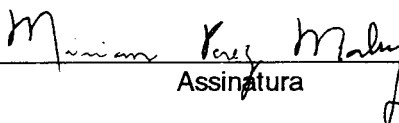
Assinatura

Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys



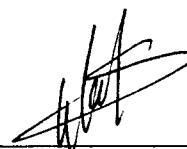
Assinatura

Profa. Dra. Miriam Perez Maluf



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



Assinatura

Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

Assinatura

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Assinatura

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Sem eles, eu nada realizaria.

À Rafaela, ao Lucca e ao Gabriel, por renovarem as minhas fontes de alegria e esperança. À toda a minha grande e maravilhosa família, pelo exemplo de união e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Dr. Paulo Arruda, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e conviver com ciência de ótima qualidade, e pelo exemplo de força de vontade e coragem para inovar sempre.

Ao co-orientador Dr. Celso E. Benedetti que, com muita paciência e dedicação, me guiou ao longo do doutorado, sempre me incentivando e indicando o melhor caminho a seguir.

Ao Dr. Adilson Leite, pela dedicação ao laboratório, e pela fonte inesgotável de conhecimento.

Aos pesquisadores Dra. Clélia Ferreira e Dr. Walter Terra, pela amizade e confiança que me dedicaram desde o início da jornada acadêmica, e pelo exemplo de liderança e sabedoria.

Ao Dr. Elliot Meyerowitz por ceder a biblioteca de cDNA de flor de *Arabidopsis*.

Aos doutores Marie-Anne Van Sluys, Miriam Maluf, Michel Vincentz, Anete Pereira de Souza, Laura Ottoboni e Márcio de Castro Silva, membros da banca examinadora.

Aos doutores Ivan Maia, Laura Ottoboni e Márcio de Castro Silva, pela importante contribuição na pré-banca.

Ao Dr. Carlos Ramos, pela leitura da tese e pelas sábias palavras nos momentos de dúvidas e desânimo.

Ao Dr. Marcelo Menossi, pelo ensino e acompanhamento durante a execução da técnica de hibridização *in situ*.

À Sílvia Regina, pela assistência cuidadosa durante o aprendizado de novas técnicas, e à Danizinha, Eduardo, Camila e Maurício pelo cuidado e manutenção do laboratório.

Às meninas da secretaria do CBMEG, Claudinha, Fabiana, Patrícia, Sandra e Tânia, e às secretárias da pós-graduação, Tereza e Zaira, que tornaram e tornam as tarefas burocráticas muito mais leves para nós.

À Tereza, Ephraim, André e Dr. Eurico, pela ajuda durante as crises emocionais e físicas.

A todos os colegas e amigos do CBMEG, nos quais incluo os professores, pela convivência extremamente agradável e prazerosa. Não vou correr o risco de nomear alguns e deixar de fora outros tantos, uma vez que minha memória nunca foi muito boa, e anda cada vez pior.

À Cinthia, por dividir as dificuldades e alegrias surgidas com os resultados obtidos no laboratório, e pela excelente companhia.

À turma antiga e que infelizmente se desfez, Mimi, Raquel, Silvinha, e Sílvia Geourgas, pelo companherismo, pelas saídas alegres, pela amizade sempre presente.

Ao Germano, Fabinho e Karen, pela força e carinho constantes durante o doutorado. Ao Fabinho, Germano e Edson, pelas pizzas depois de árduas horas de trabalho.

Ao Edson, André e Felipe, pela motivação e pelos sábios conselhos.

À Kellyzinha, Lyza, Eneida, Luzinha, Lu Gauer e Leleca, pelos almoços, jantares, papos “cabeça”, saídas, e as poucas, porém excelentes, discussões sobre trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de Plantas, do laboratório do Mano, do Michel, do Genoma, e do Paulo, por tornarem o dia-a-dia mais alegre. Novamente, deixo de citar nomes para evitar esquecer o nome de alguém, e porque a lista é muito grande.

À minha família, pela participação, dedicação e carinho ao longo de toda a vida.

Ao meu irmão Fernando e à minha cunhada Fabiana, pela amizade e confiança. Aos meus pais, pelo cuidado, apoio, dedicação, paciência, perdão e amor, sempre; e pelo lindo exemplo de humildade e generosidade.

AO CNPq, à FAPESP e aos meus pais, pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS	x
RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
Jasmonatos	5
Biossíntese dos Jasmonatos	6
Compostos Ativos da Via dos Octadecanóides	7
Processos Fisiológicos Regulados por Jasmonatos	9
Mecanismos Moleculares de Regulação por Jasmonatos	14
Mutantes com Alterações na Percepção e/ou Síntese de Jasmonatos	16
OBJETIVOS	23
MÉTODOS	24
Crescimento e Manutenção de Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
Purificação de RNA total	24
“Differential Display”	25
Isolamento de Clones de cDNA	27
Seqüenciamento de DNA	28
“Northern Blots”	28
Extração de DNA Genômico	29
“Southern Blot”	30
Síntese de Ribossonda	30
Preparação do Tecido	31
Preparação das Lâminas Cobertas com Poli-L-lisina	32
Seccionamento dos Tecidos em Micrótomo	32
Hibridização <i>in situ</i>	33
Construção de Vetores para Transformação de	35

Agrobacterium	
Transformação de agrobactérias	36
Transformação <i>in vivo</i> de Plantas de Arabidopsis	38
Técnicas Padrões em Biologia Molecular	38
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE <i>GAPB</i>	40
Resultados e Discussão	40
IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES <i>MBP</i>	45
Resultados	45
Artigo	49
Resultados	58
Discussão	60
Conclusões	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CTAB	brometo de alquiltrimetilamônio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dnase	Desoxirribonuclease
dNTPs	2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
MBP	proteína ligante de mirosinase (“myrosinase-binding protein”)
MeJA	metil jasmonato
MOPS	ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NBT	sal de nitrotetrazólio blue
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
p/v	peso/volume
pb	pares de bases
OD	densidade óptica
PCR	“polymerase chain reaction”
RNA	ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBA	butanol terciário
tRNA	RNA transportador
U	Unidade
UTP	uracila trifosfato
v/v	volume/volume

Os jasmonatos afetam vários aspectos do desenvolvimento das plantas, como senescência e desenvolvimento de grãos de pólen, e atuam como sinalizadores em respostas a estresses ambientais, como injúria mecânica e ataque de herbívoros ou patógenos.

Mutantes com alteração na percepção e/ou síntese de jasmonatos são muito utilizados em estudos da via de transdução de sinais desses fitormônios. O mutante *coi1* (coronatine insensitive) de *Arabidopsis thaliana* é insensível a ácido jasmônico, apresenta respostas alteradas a dano mecânico, e possui flores macho-estéreis, fenótipos associados à mutação no gene *COI1*.

Através da técnica de “differential display” de mRNAs, isolamos um fragmento de DNA com expressão em flores de plantas selvagens, mas não nas flores macho-estéreis do mutante *coi1*. O “screening” de uma biblioteca de cDNA de flores levou ao isolamento de dois cDNAs, homólogos às proteínas ligantes de mirosinase (“myrosinase-binding proteins” ou MBPs), encontradas normalmente em associação com o complexo mirosinase-glicosinolato em vários membros da família Brassicaceae. Esse complexo participa de reações de defesa contra patógenos e herbívoros. Os jasmonatos induzem algumas proteínas presentes no complexo, causando um aumento dos produtos de hidrólise dos glicosinolatos, alguns dos quais podem ser tóxicos a insetos e patógenos. Esses produtos também podem servir como fonte de nitrogênio e enxofre, necessários para estágios específicos do desenvolvimento da planta.

Os transcritos correspondentes aos genes *MBP1* e *MBP2* são expressos apenas e abundantemente em flores de plantas selvagens, e não são induzidos por MeJA ou dano mecânico em plântulas. A análise de “Northern blot” mostrou que os genes *MBP1* e *MBP2* estão presentes nos estágios iniciais do desenvolvimento floral. Experimentos de hibridização *in situ* revelaram que os transcritos correspondentes ao gene *MBP1* são mais expressos em flores imaturas, em vários órgãos, incluindo ovário, óvulos, estigma, filamento e antera.

Uma vez que as MBPs parecem participar do complexo mirosinase-glicosinolato, nós avaliamos a expressão do gene *TGG1*, que codifica uma isoforma de mirosinase. O gene *TGG1* apresenta expressão semelhante aos genes *MBP1* e *MBP2* ao longo dos estágios de desenvolvimento da flor, mas são expressos também em tecidos vegetativos, sendo apenas parcialmente afetados pelo gene *COI1*. Preparações de extrato bruto de proteínas solúveis revelaram que a atividade de mirosinase sobre sinigrina é maior em flores do que em folhas das plantas selvagens, e que a atividade é reduzida nos mesmos órgãos das plantas *coi1*.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que o gene *COI1* controla a expressão de *MBP* em flores e afeta significativamente a expressão e a atividade de mirosinase em *Arabidopsis*.

Jasmonates are plant hormones involved in senescence, defense and wounding responses, and pollen development.

Arabidopsis thaliana coi1 mutants (coronatine insensitive) are insensitive to methyl jasmonate and present altered responses to wounding. The flowers of the *coi1* mutant plants are male sterile, with abnormal development of pollen grain. By means of mRNA differential display technique, we have isolated a DNA fragment expressed only in flowers of *Arabidopsis*. Two related *Arabidopsis* cDNAs homologous to myrosinase-binding proteins (MBPs) were isolated during the screening of a flower cDNA library. Myrosinase-binding proteins are thought to be part of myrosinase-glucosinolate complex in plants. This complex is implicated in defense reactions against pathogens and herbivores. Jasmonates are able to induce specific proteins of the complex, thus increasing the glucosinolate hydrolytic products, some of which are toxic to insects and pathogens. These products may also be a source of nitrogen and sulphur for specific developmental stages.

The corresponding transcripts (*MBP1* and *MBP2*) differ in size and are expressed during the early stages of flower development. The transcripts were not detected in male sterile flowers of the *coi1* mutant, indicating a dependence on the COI1 function for their expression. The shorter message *MBP1* was localized in male and female organs of wild-type flowers, but it was not detected in sepals. Since MBPs are associated with the myrosinase complex, we probed the expression of a myrosinase gene (*TGG1*) during flower development and observed that, similarly to *MBP1*, *TGG1* is also expressed at earlier stages of flower development, and that the *coi1* mutation affects its expression. Although *TGG1* mRNA was also found in seedlings, leaves and siliques, and was induced by JA, the pattern of expression of *MBP1* and *TGG1* correlates well during flower development. Crude preparations of soluble protein from leaf and flower extracts revealed that myrosinase activity toward sinigrin is higher in flower than in leaves of *Arabidopsis*, and the activity is significantly reduced in these organs in the *coi1*

mutant. Our results show that *CO1* function controls the expression of MBPs in floral organs, and affects the expression and activity of myrosinase.

Jasmonatos

As plantas superiores se adaptam a mudanças do meio ambiente e a estresses bióticos alterando aspectos morfológicos, fisiológicos e de seu desenvolvimento (Wasternack e Parthier, 1997). No nível celular, essas respostas são verificadas pela mudança no padrão da expressão gênica, na composição protéica e nas atividades enzimáticas. Alterações nas condições do meio percebidas pela planta desencadeiam uma cascata de sinais que culmina com as respostas celulares. Os compostos de sinalização realizam seus efeitos por meio de uma seqüência de reações bioquímicas, conhecidas como via de transdução de sinais, que amplificam o sinal original e resultam em última instância na ativação ou repressão de genes. Entre os compostos sinalizadores em plantas estão as substâncias que promovem crescimento e desenvolvimento, como auxina, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (JA).

Nos últimos anos os octadecanóides, também denominados jasmonatos, foram reconhecidos como uma família de moléculas de sinalização que atuam em várias respostas a estresses ambientais (Creelman e Mullet, 1997), tais como injúria mecânica, ataque de herbívoros ou patógenos (Farmer e Ryan, 1990), e desidratação (Creelman e Mullet, 1995). Nas plantas saudáveis, os jasmonatos estão envolvidos na distribuição de carbono (Stintzi e Browse, 2000), na maturação e liberação de pólen (McConn e Browse, 1996; Feys *et al.*, 1994) e na senescência (Watanabe *et al.*, 2000).

O mecanismo de sinalização derivado dos octadecanóides em plantas tem um sistema paralelo nos animais, onde prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e tromboxanas são sintetizadas a partir de ácido araquidônico, através de uma via muito semelhante à da biossíntese dos jasmonatos. Esses compostos estão envolvidos em eventos inflamatórios e em resposta à dor (Mueller, 1997).

Inúmeros trabalhos vem sendo realizados com o intuito de esclarecer a via de transdução de sinais dos jasmonatos, os genes regulados por esses compostos, as enzimas envolvidas em sua biossíntese e os efeitos causados por alterações na percepção desses sinalizadores em plantas. A compreensão desses aspectos poderá nos ajudar a entender melhor a fisiologia das plantas e seus processos de adaptação às constantes alterações ambientais, bem como auxiliar no estudo de vias relacionadas à via dos octadecanóides que estejam presentes nos animais.

Biossíntese dos Jasmonatos

Os jasmonatos são sintetizados a partir de um ácido graxo poli-insaturado, o ácido linolênico (LA), encontrado predominantemente em glicerolipídeos de membrana de células vegetativas. O ácido linolênico é liberado dos lipídeos da membrana pela ação de fosfolipases, cuja ativação pode ser precedida ou mediada por eventos de fosforilação, por aumentos transitórios em Ca^{2+} citossólico e/ou por fluxo iônico (revisão em Narváez-Vásquez *et al.*, 1999). Estudo realizado com folhas de tabaco submetidas à injúria mecânica demonstrou que a transcrição de uma MAP quinase, enzima responsável pela fosforilação de proteínas durante a transdução de sinais em eucariotos, precede um aumento temporário na concentração de jasmonato. Em plantas de tabaco que superexpressam uma proteína MAP quinase transgênica, ocorre o silenciamento do gene que codifica a enzima endógena, e não há aumento nos níveis de jasmonato nem indução de genes de resposta à injúria mecânica. Esses resultados demonstram que a via de transdução de sinal de injúria mecânica é dependente de eventos de fosforilação, e que a atividade da quinase é anterior à síntese de jasmonatos (Seo *et al.*, 1995). Os alvos da quinase não estão bem estabelecidos, podendo ser fosfolipases ou lipoxigenases envolvidas na liberação e oxidação do precursor ácido linolênico (Wasternack e Parthier, 1997). Outros eventos que atuam anteriormente à síntese dos jasmonatos ainda são pouco conhecidos.

A biossíntese de JA foi inicialmente descrita por Vick e Zimmerman (1983) e ocorre em sete etapas (Fig. 1): a enzima 13-lipoxigenase (13-LOX) catalisa a conversão de ácido linolênico em ácido 13(S)-hidroperóxi-9(Z),11(E),15(Z) octadecatrienóico. Uma aleno óxido sintase (AOS) e uma aleno óxido ciclase (AOC) atuam em sequência e formam o derivado ciclopentanona ácido 12-oxo-fitodienóico (OPDA). As etapas iniciais de síntese acontecem no cloroplasto (Koch *et al.*, 1999), a partir de onde o OPDA é provavelmente exportado para o citossol. A enzima OPDA redutase reduz o OPDA e forma o ácido 12-oxo-fitodienóico (OPC 8:0), que é posteriormente degradado através de 3 passos consecutivos de β -oxidação. O (+)-7-iso-JA formado é rapidamente convertido em sua estrutura estereoisomérica estável, o (-)-JA (Wasternack *et al.*, 1998; Parchmann *et al.*, 1997).

Compostos Ativos da Via dos Octadecanóides

A via de sinalização baseada nos octadecanóides é composta de pelo menos 4 classes de compostos com estruturas diferentes, e provavelmente dotados de capacidade de sinalização (Fig. 1). São elas: (a) ácidos graxos acíclicos, entre eles o ácido linolênico; (b) ácidos graxos ciclopentanóides com 18 carbonos, sendo o OPDA o primeiro composto ativo da via, nessa classe; (c) ácidos graxos ciclopentanóides com 12 carbonos como epi-JA e JA; e (d) aminoácidos conjugados de intermediários da cascata (Koch *et al.*, 1999, Blechert *et al.*, 1999, Wasternack *et al.*, 1998, Tamogami *et al.*, 1997). Além da conjugação de aminoácidos, JA e outros intermediários podem sofrer outras modificações químicas, como metilação, hidroxilação e esterificação (Wasternack e Parthier, 1997). Os novos compostos formados possuem atividade em processos fisiológicos regulados por jasmonatos.

As concentrações absolutas e relativas dos membros ativos da família dos jasmonatos conferem às plantas um perfil de oxilipinas. Esse perfil é dinâmico, e varia durante o desenvolvimento das plantas e em decorrência dos estresses ambientais a que elas são submetidas (Weber *et al.*, 1997). Weber e

colaboradores (1997) mostraram que, em plantas saudáveis de *Arabidopsis* e batata, as concentrações endógenas relativas de OPDA, JA e dinor-OPDA (um composto derivado de um ácido graxo de 16 carbonos) são diferentes. Após injúria mecânica, os níveis relativos desses compostos são alterados de forma distinta nas duas espécies estudadas. Os autores sugerem que o perfil de oxilipinas pode refletir a fisiologia do tecido em um determinado momento, e que os membros da família dos jasmonatos devem agir como um complexo, e não como moléculas únicas de papel biológico definido e restrito.

Parchmann e colaboradores (1997) também mostraram a diversidade da via dos octadecanóides investigando os níveis de alguns de seus compostos ativos em cultura de células de diferentes plantas, após incubação com preparações de parede celular de fungos. Em cinco de sete espécies de plantas estudadas, os níveis máximos de OPDA excederam o pico de JA entre 3 e 5 vezes, enquanto nas plantas restantes JA foi o metabólito mais acumulado. Estudos realizados com diferentes espécies de plantas mostraram uma diferença na atividade de JA e seu metil éster, metil jasmonato (MeJA), corroborando a existência de vários compostos ativos entre os octadecanóides. MeJA se mostrou mais ativo na indução de genes de inibidores de protease em tabaco, e do processo de senescência em cotilédones de girassol, enquanto JA foi mais eficiente na indução de fitoalexinas em cultura de células em suspensão de arroz (Ward *et al.*, 1999).

Processos Fisiológicos Regulados por Jasmonatos

Uma das primeiras funções atribuídas a JA e MeJA foi a indução de senescência em plantas (Ueda e Kato, 1980). Além disso, JA e MeJA inibem a germinação de sementes não dormentes e estimulam a germinação de sementes dormentes, provavelmente alterando a sensibilidade das mesmas a ABA (Creelman e Mullet, 1997). MeJA inibe o crescimento de raízes em algumas espécies de plantas, como por exemplo *Arabidopsis* (Staswick *et al.*, 1992). Algumas respostas à irradiação UV são mediadas, em parte, por alterações nas concentrações de JA e na sua via de sinalização (Conconi *et al.*, 1996). JA ou um

derivado, ácido tuberônico, parece desempenhar um papel na formação de tubérculos (Creelman e Mullet, 1997).

Os níveis de JA nas plantas variam de acordo com o tecido e o tipo celular, o estágio de desenvolvimento, e em resposta a diferentes estímulos (Creelman e Mullet, 1997). Os jasmonatos são encontrados por toda a planta, com as maiores concentrações sendo observadas em tecidos em crescimento, como o hipocótilo, a plúmula, o ápice radicular, flores, frutos e folhas jovens (Creelman e Mullet, 1995). Os níveis de JA são maiores em folhas jovens de feijão em desenvolvimento, que necessitam de carbono e nitrogênio para o seu metabolismo, do que em folhas maduras completamente expandidas, sugerindo um papel dos jasmonatos na disponibilização desses elementos (Creelman e Mullet, 1995).

Os níveis de JA são altos em estruturas reprodutivas, sugerindo uma função desse composto na formação de flores, frutos e sementes. Ácido jasmônico regula a maturação do pólen e a deiscência de anteras, como foi demonstrado por trabalhos realizados com mutantes que possuem deficiência na síntese ou na percepção desse sinalizador (McConn e Browse, 1996; Feys *et al.*, 1994). A presença de JA e derivados de ácidos graxos voláteis relacionados a esse composto, na flor, sugere também uma função dos jasmonatos na atração de insetos e na dispersão de pólen (Creelman e Mullet, 1997). Outros aspectos controlados por JA em estruturas reprodutivas incluem: amadurecimento e composição de carotenóides de frutos, e expressão de genes que codificam proteínas de reserva (VSPs, Creelman e Mullet, 1997). O amadurecimento dos frutos de tomate e de maçã parece ocorrer através da ativação, por jasmonatos, de enzimas responsáveis pela síntese de etileno (Sheng *et al.*, 2000, Czapski e Saniewski, 1992). Nas flores e nos frutos em desenvolvimento de feijão e de *Arabidopsis*, os genes que codificam as VSPs são muito expressos (Creelman e Mullet, 1997, Berger *et al.*, 1995). As proteínas VSPs nesses tecidos parecem servir de estoque temporário de carbono e de nitrogênio, para uso posterior durante a rápida síntese de proteínas de reserva das sementes (Creelman e Mullet, 1997).

Aplicações de JA na folha causam decréscimo na expressão de genes nucleares e de cloroplasto envolvidos na fotossíntese (Reinbothe *et al.*, 1994a), além de uma perda de clorofila nas folhas e em culturas de células (Creelman e Mullet, 1995). A habilidade de JA de inibir a expressão de genes envolvidos em fotossíntese sugere que os jasmonatos possam auxiliar na redução da capacidade de assimilação de carbono sob condições de excesso de luz ou açúcar. A indução da síntese de VSP estimulada por JA cria um escoamento para o carbono e o nitrogênio (Creelman e Mullet, 1995).

Em 1990, Farmer e Ryan demonstraram que jasmonato e seu metil éster, aplicados exogenamente, são prontamente captados pelas células da planta, levando à ativação da expressão de genes de defesa. Desde então, foi demonstrado que preparações de parede celular de fungos, antibióticos bacterianos, elicitores derivados da parede celular de plantas ou de fungos, injúria mecânica, e uma variedade de outros estímulos levam a uma rápida síntese de JA endógeno (Mueller, 1997). Esse, por sua vez, ativa a transcrição de genes de defesa, produzindo uma variedade de proteínas induzidas por jasmonato ou JIPs (Parchmann *et al.*, 1997), metabólitos secundários de função antibiótica (Parchmann *et al.*, 1997, Gundlach *et al.*, 1992), proteínas fungicidas, e proteínas celulares possivelmente envolvidas na síntese de barreiras à infecção (Creelman e Mullet, 1997), promovendo resistência ao ataque de herbívoros e patógenos em plantas. Mutações que reduzem a produção de JA normalmente aumentam a suscetibilidade das plantas a herbívoros. O mutante de tomate *def1*, deficiente na síntese de OPDA, não acumula inibidores de proteinase em resposta à injúria mecânica, e é mais suscetível ao inseto *Manduca sexta* do que as plantas selvagens (Howe *et al.*, 1996). O mutante de *Arabidopsis fad3-2fad7-2fad8*, deficiente em JA e LA, é rapidamente atacado por larvas de *Bradysia impatiens*, recuperando sua capacidade de defesa quando tratado com MeJA (McConn *et al.*, 1997)

Os herbívoros, entre eles os insetos, são responsáveis por dois tipos de sinalização que levam à ativação da expressão de genes de defesa: a mecânica e a química. Após injúria mecânica, os níveis endógenos de JA aumentam,

possivelmente devido à ativação das enzimas presentes na via metabólica do composto. Isso ocorre por exemplo em plantas de tabaco e batata (Martín *et al.*, 1999), onde a ativação de $\omega 3$ dessaturases promove um aumento na concentração de ácido linolênico intracelular (Wasternack e Parthier, 1997), acionando a via dos octadecanóides. Esse aumento endógeno das oxilipinas ativas precede a ativação transcripcional do gene *Pin2* de batata e tomate, e de outros genes de resposta a injúria mecânica (Martín *et al.*, 1999, Titarenko *et al.*, 1997). Alguns hormônios podem agir em conjunto com JA para a ativação dos genes de resposta à injúria mecânica, como por exemplo o etileno e o ácido abscísico (Stotz *et al.*, 2000; Wasternack e Parthier, 1997). A injúria mecânica e as respostas relacionadas não são suficientes, no entanto, para explicar todas as mudanças bioquímicas e fisiológicas que acontecem em resposta ao ataque de insetos (Stotz *et al.*, 2000). Os insetos liberam substâncias químicas, os elicitores, capazes de induzir a emissão de sinais voláteis de alarme pela planta atacada, sinais esses que podem atrair predadores e parasitóides dos insetos (Farmer *et al.*, 1998).

O ataque de herbívoros gera também um sinal sistêmico que provoca a ativação da via dos octadecanóides em locais distantes da planta. Esse sinal é originado no local do ferimento, com a hidrólise de pró-sistemina em sistemina. A sistemina é então transportada via floema, e sua percepção desencadeia a indução da via dos jasmonatos (Wasternack e Parthier, 1997). Experimentos de bloqueio da via de sinalização de injúria mecânica, através da expressão de um gene antissense de pró-sistemina, mostraram a inibição do acúmulo de inibidores de proteinase e a consequente redução da resistência de plantas de tabaco à larva de *Manduca sexta* (Orozco-Cardenas *et al.*, 1993).

Além da sinalização interna da planta em resposta à herbivoria, os jasmonatos voláteis, como MeJA, parecem desempenhar papel de comunicação entre plantas. Foi verificado que MeJA liberado de plantas de *Artemisia tridentata* machucadas é capaz de induzir a atividade da polifenol oxidase, uma proteína com possível função de defesa, e reduzir os danos causados por herbívoros a folhas de tabacos vizinhos (Karban *et al.*, 2000).

Os jasmonatos se acumulam após a infecção por patógenos e induzem a expressão de compostos com ação antimicrobiana, provavelmente promovendo a ativação da transcrição de genes que codificam as enzimas biossintéticas desses compostos (Vijayan *et al.*, 1998, Bleichert *et al.*, 1995). Alguns trabalhos demonstraram que a resistência de plantas a patógenos é dependente da sinalização de JA. A transcrição do gene que codifica a proteína antifúngica defensina, *PDF1.2*, é induzida em plantas selvagens de *Arabidopsis* infectadas com o fungo *Alternaria brassicicola*. O mesmo fungo, no entanto, é incapaz de induzir a expressão do gene *PDF1.2* no mutante *coi1* de *Arabidopsis*, que é deficiente na sinalização de jasmonato (Penninckx *et al.*, 1998). O fungo *Pythium mastophorum* não induz a expressão de genes sabidamente ativados por jasmonatos no mutante *fad3-2 fad7-2 fad8* de *Arabidopsis*, deficiente no acúmulo de jasmonato. O mutante *fad3-2 fad7-2 fad8* é protegido da infecção por *P. mastophorum* quando recebe a aplicação exógena de jasmonato (Vijayan *et al.*, 1998).

Normalmente, a interação de um patógeno com um hospedeiro resistente inicia uma resposta hipersensitiva (HR) localizada e, ao mesmo tempo, sinais de longa distância que induzem a expressão de genes que codificam proteínas relativas a patogenicidade (proteínas PR) nas partes não infectadas da planta, em um processo conhecido como resistência sistêmica adquirida ou SAR (Vijayan *et al.*, 1998). Várias moléculas de sinalização parecem estar envolvidas na coordenação da SAR, entre elas o ácido salicílico, o metil jasmonato, o etileno, o peróxido de hidrogênio, e radicais superóxido (Vijayan *et al.*, 1998, Penninckx *et al.*, 1998 e Thomma *et al.*, 1998). Um modelo para a resistência sistêmica adquirida em *Arabidopsis* coloca as vias de sinalização de JA e de SA em paralelo (Farmer *et al.*, 1998). O ataque de um patógeno avirulento promove a ativação de lipoxigenases e hidroperóxido liases, responsáveis pela produção de hidroperóxidos e alcenos tóxicos, que promovem a morte do patógeno e de células da planta durante a resposta hipersensitiva. JA e SA ativam a expressão de genes de defesa em tecidos distantes e contribuem para a SAR (Farmer *et al.*, 1998).

Um outro tipo de interação planta-patógeno ocorre durante a resistência sistêmica induzida ou ISR, processo no qual a resistência à infecção por um patógeno é induzida pela colonização precedente da planta com um microorganismo não patogênico. Em *Arabidopsis*, a ISR mediada por rizobactéria contra a bactéria *Pseudomonas syringae* pv *tomato* é dependente de jasmonato e etileno (Pieterse *et al.*, 1998). O etileno está envolvido na geração ou translocação do sinal de ISR a partir do local da indução da resposta, e provavelmente as plantas que desenvolvem ISR possuem um potencial maior de produção de etileno quando ocorre a infecção com o microorganismo patogênico. Com relação aos jasmonatos, parece que as plantas que expressam ISR possuem um potencial aumentado para a indução de alguns genes de defesa regulados por JA, levando a uma eficiência maior da expressão desses genes depois da infecção pelo patógeno (Pieterse *et al.*, 2000).

Uma das respostas de plantas contra o ataque de patógenos é a síntese de compostos com atividade antimicrobiana, conhecidos como metabólitos secundários (García-Ponce e Rocha-Sosa, 2000). Os jasmonatos induzem o acúmulo de metabólitos secundários que fazem parte do sistema de defesa em plantas (Creelman e Mullet, 1997 e Tamogami *et al.*, 1997), como terpenóides (van der Fits *et al.*, 2000), alcalóides (Gundlach *et al.*, 1992) e fenólicos (Sharan *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1997). Em arroz, tanto JA endógeno quanto JA aplicado exogenamente promovem a síntese de um flavonóide que possui alta atividade antimicrobiana e se acumula no local da infecção e em tecidos próximos (Tamogami *et al.*, 1997, Rakwal *et al.*, 1996).

Mecanismos Moleculares de Regulação por Jasmonatos

Os jasmonatos, possivelmente, interagem com receptores nas células para ativar vias de transdução de sinais, culminando com alterações na transcrição ou tradução de genes, que participam dos diversos processos fisiológicos mediados por esses compostos (Creelman e Mullet, 1997). Possíveis receptores de

jasmonatos em *Arabidopsis* não foram encontrados, e sua localização intracelular é desconhecida (Farmer *et al.*, 1998).

A regulação da transcrição gênica por jasmonatos também não está esclarecida. Promotores de dois genes induzidos por MeJA, *Pin2*, inibidor de proteinase 2 de batata (Kim *et al.*, 1992) e *VspB*, proteína de reserva de soja (Mason *et al.*, 1993), foram analisados e foi encontrada uma região comum de 50 pb que conferia resposta a JA. A região contém uma sequência G-box (CACGTG), que pode ser um sítio potencial para a ligação de fatores de transcrição do tipo bZIP. A bestatina, um inibidor de aminopeptidases em plantas e animais, é capaz de induzir a expressão de genes de defesa regulados por JA em folhas de tomate. Ao contrário de outros sinais que usam a via dos octadecanóides para promover a expressão gênica, a bestatina não causa um aumento na concentração intracelular de JA (Schaller *et al.*, 1995). Sua ação deve estar relacionada à inibição de uma protease envolvida na regulação de fatores de transcrição, sugerindo que a expressão de genes modulados por jasmonatos pode ser normalmente inibida pela ação de uma aminopeptidase (Creelman e Mullet, 1997, Schaller *et al.*, 1995).

Ácido jasmônico reprime o início da tradução de proteínas relacionadas à fotossíntese, como as proteínas RBCS, subunidade menor da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase e CAB, proteína ligante de clorofila a/b (Reinbothe *et al.*, 1993a). Uma proteína induzida por ácido jasmônico em cevada, JIP60, é inativadora de ribossomos e capaz de dissociar polissomos com transcritos de *RbcS* e *Cab* provenientes de tecidos tratados com ácido jasmônico (Reinbothe *et al.*, 1994b). Essa clivagem de polissomos pode ser responsável pela degradação de proteínas envolvidas em fotossíntese, mas o mecanismo pelo qual JIP60 discrimina os polissomos que possuem transcritos que devem ser eliminados não é conhecido.

A subunidade maior da proteína ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase sofre regulação pós-transcricional (RBCL; Reinbothe *et al.*, 1993b). O tratamento de folhas de cevada com ácido jasmônico induz o

aparecimento de um transcrito da *Rbcl* de tamanho maior do que o transcrito obtido a partir de folhas não tratadas. A sequência extra transcrita é complementar à extremidade 3' do RNA ribossômico 16S. A exata complementariedade entre essas duas seqüências sugere um possível pareamento entre as mesmas, o que inibiria a tradução da proteína (Reinbothe *et al.*, 1993b). Não se sabe ainda qual o mecanismo que controla a síntese do transcrito maior em resposta ao ácido jasmônico.

Mutantes com Alterações na Percepção e/ou Síntese de Jasmonatos

Arabidopsis thaliana tem sido utilizada como planta modelo para estudos de diferentes vias de transdução de sinais mediadas por fitormônios. A análise de plantas mutantes ou transgênicas com alterações na percepção ou nos níveis dos hormônios, e de compostos que afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, possibilita a caracterização dessas substâncias (Creelman e Mullet, 1997).

Os mutantes de *Arabidopsis* com sensibilidade reduzida a MeJA caracterizados até o momento foram: *jar1* ("jasmonate resistant", Staswick *et al.*, 1992), *coi1* ("coronatine insensitive", Feys *et al.*, 1994), *jin1* e *jin4* ("methyl jasmonate-insensitive", Berger *et al.*, 1996). Todas as mutações são segregadas como traços mendelianos recessivos, e as mutações *jar1* e *jin4* podem ser alélicas. Os mutantes *jar1*, *jin1* e *jin4* foram selecionados por apresentarem redução da inibição do crescimento da raiz, provocada por MeJA, em comparação com as plantas selvagens. O crescimento das raízes é mais afetado por MeJA nos mutantes *jin4* e *jar1* do que em *coi1* e *jin1*. Além desse fenótipo, os mutantes apresentam diferenças no acúmulo de proteínas de reserva do tipo VSPs. As VSPs não são produzidas em flores de *coi1*, apesar de seus níveis serem elevados nas flores das plantas selvagens e dos mutantes *jin1* e *jin4*. As VSPs também não são induzidas por MeJA em folhas das plantas *coi1*, *jar1*, *jin1* e *jin4*, e o mutante *coi1* não apresenta indução de *LOX1* por MeJA. Apenas as plantas *coi1*

são macho-estéreis e não acumulam antocianinas em resposta a MeJA (Berger *et al.*, 1996, Benedetti *et al.*, 1995, Feys *et al.*, 1994, Staswick *et al.*, 1992).

O mutante de *Arabidopsis opr3* foi isolado como um mutante macho-estéril no qual um membro da família gênica *OPR* (OPDA redutase), designado *OPR3*, foi rompido por uma inserção de T-DNA (Stintzi e Browse, 2000). O mutante *opr3*, assim como o mutante *fad3-2 fad7-2 fad8* (Stintzi e Browse, 2000, McConn e Browse, 1996), possui as seguintes características em relação ao fenótipo macho-estéril: os órgãos florais se desenvolvem normalmente dentro do botão floral, mas os filamentos não se alongam o suficiente para posicionar os lóculos das anteras acima do estigma por ocasião da antese; não há deiscência dos lóculos da antera quando ocorre a abertura da flor; e os grãos de pólen são predominantemente inviáveis. A aplicação de JA aos botões florais em um estágio específico do desenvolvimento é capaz de reverter os três defeitos no mutante *opr3* (Stintzi e Browse, 2000), bem como no mutante *fad3-2 fad7-2 fad8* (McConn e Browse, 1996). A isoforma *OPR3* é a única enzima capaz de produzir o JA necessário para a maturação e liberação de pólen (Stintzi e Browse, 2000).

O mutante *coi1* foi selecionado pela insensibilidade à fitotoxina coronatina (Feys *et al.*, 1994). A coronatina é uma fitotoxina produzida por alguns patovares de *Pseudomonas syringae* (Bender *et al.*, 1993, Wiebe e Campbell, 1993), e não apresenta especificidade contra a planta hospedeira. A coronatina é um fator de virulência em doenças causadas por essas bactérias, sendo importante nos passos iniciais da infecção, em interações compatíveis de planta-patógeno (Budde e Ullrich, 2000).

Os efeitos biológicos da coronatina são: a clorose de folhas e a promoção de senescência em tabaco, hipertrofia do tubérculo de batata, inibição do crescimento de raiz em trigo, síntese de etileno em tabaco, e síntese de inibidores de proteinase em tomate (Bender *et al.*, 1999). Em *Arabidopsis*, a coronatina induz o acúmulo de antocianinas no local da infecção (Bender *et al.*, 1999).

A coronatina é constituída por dois elementos, o ácido coronafácico (CFA) e o ácido coronâmico (CMA). CFA e JA possuem estruturas e atividades biológicas

semelhantes quando testados em ensaios de resposta a JA (Budde e Ullrich, 2000). O CFA é capaz de impedir o reconhecimento de patógenos e inibir a HR, dependendo da concentração e do momento da adição na área infiltrada com o patógeno, sugerindo uma função como mímico molecular do JA (Budde e Ullrich, 2000). Por outro lado, a coronatina compartilha semelhança estrutural e funcional com o OPDA, possuindo respostas moleculares idênticas a OPDA em muitos ensaios, como na indução de compostos voláteis em *Pasheolus lunatus* (Koch *et al.*, 1999), e na mecanotransdução em gavinhas de *Bryonia dioica* (Blechert *et al.*, 1999). Essas semelhanças sugerem que a coronatina pode mimetizar compostos de sinalização derivados da via dos octadecanóides em plantas superiores (Budde e Ullrich, 2000, Feys *et al.*, 1994). Apesar das semelhanças funcionais, apenas coronatina é capaz de induzir o aumento da espessura da parede celular e causar mudanças na estrutura de cloroplastos e clorose em tomate, enquanto CFA e MeJA não (Palmer e Bender, 1995). Esses fatos sugerem que coronatina não age somente como mímico molecular dos octadecanóides.

O mutante de *Arabidopsis coi1* é insensível a coronatina e MeJA, é macho-estéril (Fig.2; Feys *et al.*, 1994), e é mais sensível à injúria mecânica que o tipo selvagem, apesar de ser resistente à infecção por *Pseudomonas syringae* (Feys *et al.*, 1994, C. E. Benedetti, resultados não publicados). O mutante *coi1* é incapaz de induzir a expressão de alguns genes de defesa como *PDF1.2*, *PR-3* e *PR-4*, e é mais suscetível a alguns fungos patogênicos, como por exemplo *Alternaria brassicicola* e *Botrytis cinerea*, do que as plantas do tipo selvagem (Thomma *et al.*, 1998).

O gene *COI1* também afeta o desenvolvimento das flores. As flores *coi1* são macho-estéreis, produzindo anteras e grãos de pólen anormais (Fig. 2). O estigma e o estilete da flor do mutante *coi1* são aparentemente normais e as vagens se desenvolvem completamente quando o pólen da flor selvagem é usado para fertilizar a flor *coi1*, resultando na produção de sementes viáveis. O fenótipo do órgão masculino da flor *coi1* é idêntico ao apresentado pelos mutantes *fad3-2 fad7-2 fad8* e *opr3*, tendo os filamentos dos estames mais curtos do que o tipo selvagem, apresentando ausência de deiscência da antera, e grãos de pólen

inviáveis, com grandes vacúolos no citoplasma. Além disso, o conteúdo de proteínas solúveis de flores das plantas mutante *coi1* e selvagem é diferente (Feys *et al.*, 1994). Possivelmente, a insensibilidade do mutante *coi1* a MeJA resulta na ausência de um ou mais produtos gênicos dependentes dos jasmonatos, e que se fazem necessários para o desenvolvimento normal da antera.

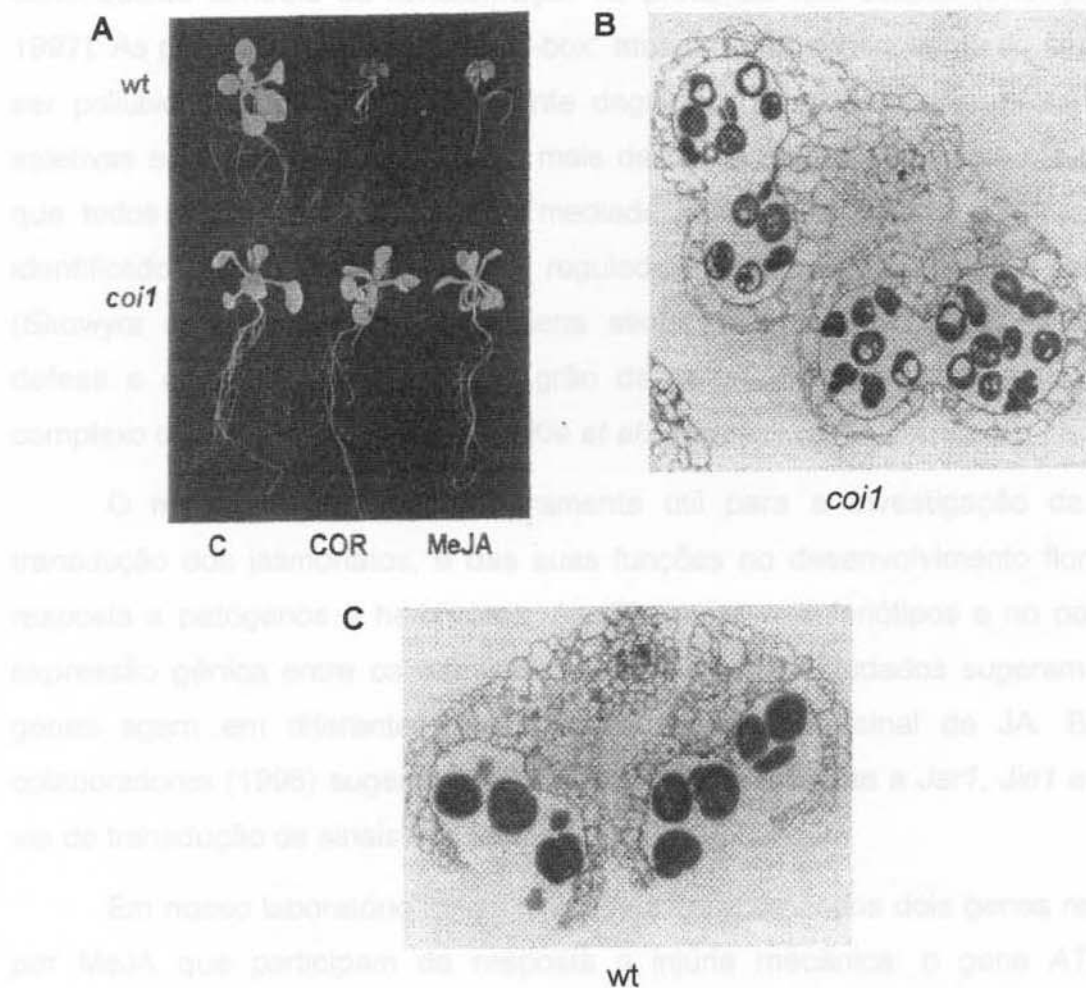


Figura 2- Fenótipos associados à mutação do gene *COI1*. **A.** O mutante *coi1* não sofre inibição do crescimento da raiz quando tratado com coronatina (COR) ou metil jasmonato (MeJA). A inibição é observada nas plântulas selvagens (wt) tratadas. As flores do mutante *coi1* são macho-estéreis. O desenvolvimento do grão de pólen é anormal, originando grãos de pólen inviáveis, com grandes vacúolos no citoplasma, e a antera não sofre deiscência (**B**). **C.** Antera deiscência de flor de planta selvagem (wt), com grãos de pólen maduros. Retirado de Feys *et al.*, 1994.

O gene *COI1* foi isolado e seqüenciado (Xie *et al.*, 1998). A seqüência deduzida da proteína COI1 contém um motivo “F-box” e domínios repetitivos ricos em leucina (LRR), apresentando homologia com outras três proteínas com domínios “F-box” e LRR: TIR1, Skp2, e Grr1. Proteínas com motivo “F-box” participam do complexo de ubiquitinação, responsável pela degradação e consequente controle da concentração de proteínas nas células (Skowyra *et al.*, 1997). As proteínas com domínio “F-box” atuam no reconhecimento do substrato a ser poliubiquitinizado e posteriormente degradado (Fig. 3). Essas proteínas são seletivas e capazes de reconhecer mais de um substrato. É importante ressaltar que todos os alvos de destruição mediada por proteínas com domínio “F-box” identificados até o momento são reguladores de eventos centrais na célula (Skowyra *et al.*, 1997). COI1 poderia seqüestrar reguladores de resposta de defesa e de desenvolvimento de grão de pólen, dependentes de JA, para o complexo de ubiquitinação (Fig. 3; Xie *et al.*, 1998).

O mutante *coi1* é uma ferramenta útil para a investigação da via de transdução dos jasmonatos, e das suas funções no desenvolvimento floral, e na resposta a patógenos e herbívoros. As diferenças nos fenótipos e no padrão de expressão gênica entre os mutantes de *Arabidopsis* estudados sugerem que os genes agem em diferentes níveis da transdução de sinal de JA. Berger e colaboradores (1996) sugerem que *Coi1* atue anteriormente a *Jar1*, *Jin1* e *Jin4* na via de transdução de sinais dos jasmonatos.

Em nosso laboratório foram isolados e caracterizados dois genes regulados por MeJA que participam da resposta a injúria mecânica: o gene *ATHCOR1* (Benedetti e Arruda, 2001; Benedetti *et al.*, 1998) e o gene *OPR3* (Costa *et al.*, 2000). O gene *ATHCOR1* é induzido por MeJA, injúria mecânica e coronatina em plantas de *Arabidopsis* selvagem, mas não no mutante *coi1*. *ATHCOR1* é expresso em folhas, flores e frutos da planta selvagem, mas não é detectado em raízes. A proteína codificada por *ATHCOR1*, denominada COR1, é uma clorofilase (Benedetti e Arruda, 2001, Tsuchiya *et al.*, 1999). O gene *OPR3* é homólogo às oxofitodienoato redutases (OPRs) de *Arabidopsis*, que participam da via de biossíntese de JA, catalisando a redução de OPDA. *OPR3* é rapidamente induzido

em folhas após injúria mecânica ou tratamento com MeJA em plantas selvagens, mas sua expressão é significativamente reduzida em folhas feridas do mutante *coi1* (Costa *et al.*, 2000).

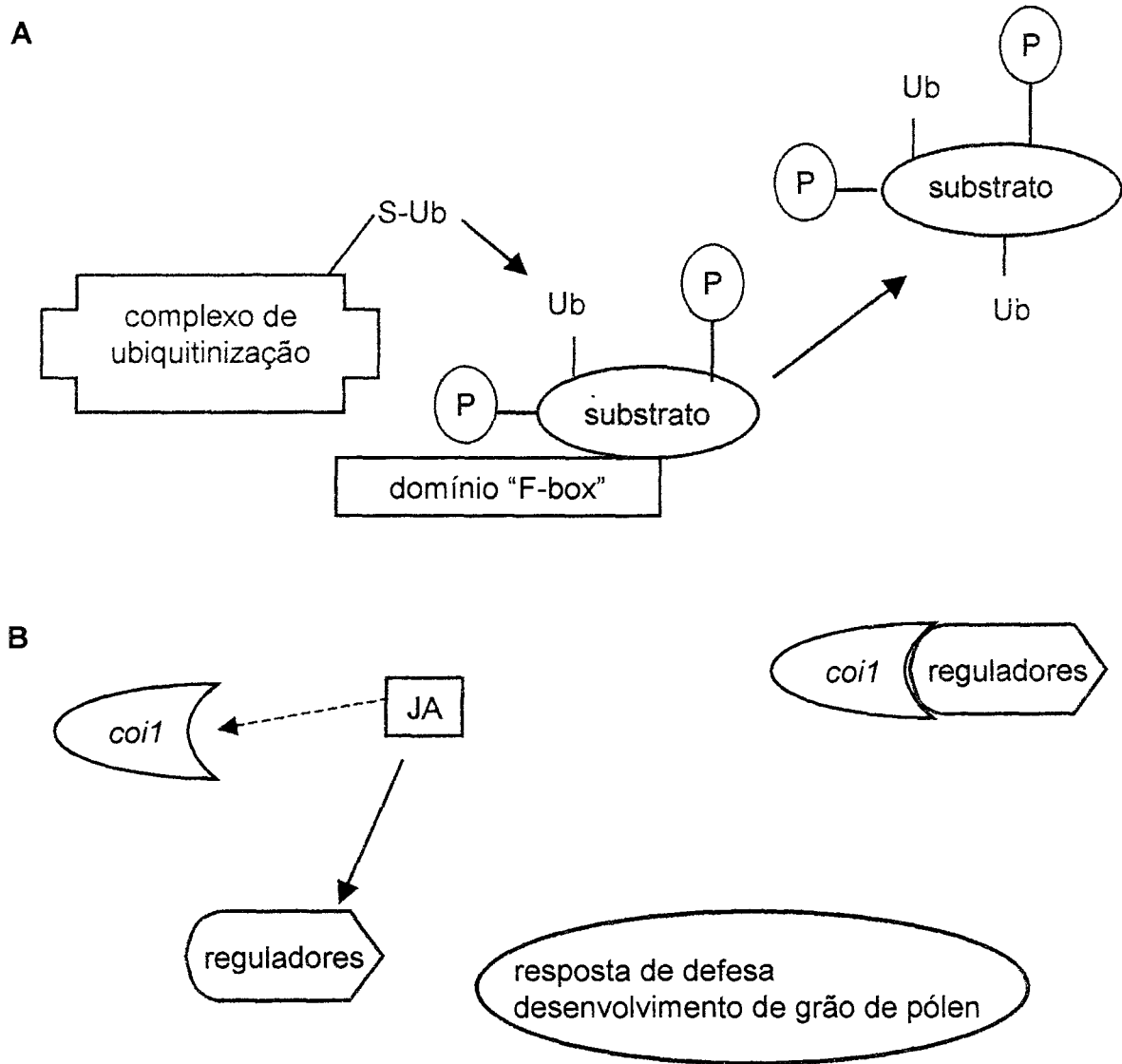


Figura 3- Mecanismo de ação de proteínas com domínio “F-box” e da proteína COI1. **A.** Proteínas com domínio “F-box” participam do complexo de ubiquitinização, e são responsáveis pelo reconhecimento do substrato a ser poliubiquitinizado e posteriormente degradado. **B.** A proteína COI1, que contém motivo “F-box”, poderia atuar seqüestrando reguladores de resposta de defesa e de desenvolvimento de grão de pólen, dependentes de JA, e encaminhando-os para o complexo de ubiquitinização.

Nesta tese de doutorado descrevemos o isolamento e a caracterização de dois genes expressos apenas nas flores de plantas selvagens, cuja transcrição é, portanto, dependente do gene *CO/1*. Os resultados desse trabalho resultaram na publicação de um artigo na revista *Planta*, que será aqui apresentado como parte da tese, no item Resultados.

OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram o isolamento de genes regulados por coronatina e metil jasmonato em plantas de *Arabidopsis*, e sua posterior caracterização quanto à expressão espacial e temporal, à dependência do gene *COI1*, e função no metabolismo da planta.

Crescimento e manutenção de plantas de *Arabidopsis thaliana*

As plantas de *Arabidopsis* (ecótipo Columbia-Col-0) foram crescidas em meio Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) ou em vasos contendo solo vegetal/vermiculita (1:1), em temperatura de 20-22°C, em condições de dia longo (16h luz). Sementes F2 de uma população segregante para o mutante *coi1* foram geradas através da polinização de plantas mutantes *coi1* com grãos de pólen de plantas selvagens, germinação das sementes resultantes, e autopolinização das plantas F1 germinadas. A seleção dos mutantes *coi1* a partir das sementes F2 foi feita em meio MS com metil jasmonato (10 μ M), com base no fenótipo das plântulas em comparação com o fenótipo desenvolvido pelo selvagem: ausência de inibição de crescimento e ausência de acúmulo de pigmentos do tipo antocianinas. Após a germinação, plantas selvagens e mutantes foram transferidas para meio MS fresco ou transferidas para solo/vermiculita e crescidas nas mesmas condições de luz até o estágio de florescimento.

Purificação de RNA total

O RNA total utilizado para “differential display” foi extraído de acordo com a técnica descrita por Vewoerd *et al.* (1989). Plântulas de *Arabidopsis* selvagem e mutante *coi1* submetidas a tratamento com coronatina por 4h, e flores de plantas selvagem e mutante, foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com o auxílio de bastão de vidro até a obtenção de um pó, que foi solubilizado em 1ml de fenol e 1ml de tampão de extração (MOPS 0,1 M pH 7,8 contendo LiCL 0,1 M, EDTA 10 mM e SDS 1%) a 80°C. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e mantidas a 80°C por 5 min. Ao fim desse período, foi adicionado à amostra 1ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a seguir a 12.000 rpm por 5 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e extraído com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico

(25:24:1, v/v/v), e a seguir extraído duas vezes com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). O sobrenadante resultante foi precipitado durante a noite em LiCl na concentração final de 2 M a 4°C. O RNA foi recolhido por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4°C, ressuspenso em H₂O DEPC e precipitado em 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto por 1 hora a –20°C. Após centrifugação, o RNA foi lavado com etanol 70%, seco, ressuspenso em H₂O DEPC com inibidor de RNase na concentração final de 10 U (RNAguard, Pharmacia Biotech) e mantido a –70°C.

O RNA total de diferentes órgãos da planta, incluindo raiz, folha, flor e fruto, e o RNA de plântulas tratadas com metil jasmonato ou coronatina foi extraído seguindo-se o protocolo descrito acima. O tratamento com metil jasmonato foi realizado pela adição do composto em meio MS na concentração final de 10 µM. Plântulas selvagens e do mutante *coi1* com aproximadamente 3 semanas foram transferidas para placas contendo MS e metil jasmonato ou coronatina, e permaneceram na câmara de crescimento durante o tempo de tratamento, ao final dos quais foram congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA. O RNA de plântulas transferidas para meio MS sem metil jasmonato ou coronatina foi extraído e utilizado como controle.

O RNA foi quantificado através de leitura da absorbância das amostras a 260 nm, assumindo que $A_{260}=1,0$ para 40 µg/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989). A qualidade do RNA purificado foi verificada através de eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído (Sambrook *et al.*, 1989).

"Differential Display"

A técnica de "differential display" de RNAs mensageiros (mRNA) de eucariotos foi inicialmente descrita por Liang e Pardee (1992) e vem sendo utilizada na identificação e caracterização de espécies de mRNAs expressos diferencialmente em tecidos ou tipos celulares. A técnica consiste na transcrição reversa de uma subpopulação de mRNA usando oligonucleotídeos ancoradores (T₁₂VN, GIBCO-BRL), que se anelam à cauda poli-A dos mRNAs, e na subsequente amplificação dos cDNAs com o oligonucleotídeo ancorador e um

oligonucleotídeo arbitrário (10 mers da Operon Technologies), segundo os protocolos descritos por Liang e Pardee (1994).

O RNA total (0,1 µg) foi misturado com tampão (1X) de transcriptase reversa (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Stratagene), contendo DTT 10 mM, dNTPs 20 µM e 1 µM do oligonucleotídeo ancorador. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 min para desfazer híbridos de RNA e resfriada posteriormente a 37°C por 10 min para permitir o anelamento dos oligonucleotídeos. A enzima transcriptase reversa (100 U) foi então adicionada à mistura, que foi incubada por 1h a 37°C. A reação foi interrompida denaturando-se a enzima por aquecimento a 95°C durante 5 min. A mistura com os cDNAs foi mantida a -70°C.

Após a transcrição reversa de uma subpopulação de mRNAs, oligonucleotídeos arbitrários foram utilizados em conjunto com os oligonucleotídeos ancoradores para amplificar fragmentos de DNA através da reação de PCR. Um décimo do volume da reação de transcrição reversa foi adicionado a tampão de PCR (1X) contendo MgCl₂ 1,25 mM, dNTPs 2 µM, ³³P- α ATP 10 µCi, 1 µM do oligonucleotídeo ancorador, 1 µM do oligonucleotídeo arbitrário e 1 U de Taq polimerase (Aiello *et al.*, 1994). As condições de reação de PCR foram: 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 40°C por 2 min, 72°C por 30 seg e posterior extensão a 72°C por 5 min (Liang e Pardee, 1992). A escolha dos oligonucleotídeos arbitrários foi feita com base no seu conteúdo de G+C (50-60%), no baixo grau de autoanelamento ou formação de dímeros, e na presença de Gs ou Cs na posição 3'. Nessa reação de PCR nucleotídeos marcados foram incorporados nos fragmentos de DNA.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 6% com uréia 8 M (Sambrook *et al.*, 1989), em condições denaturantes, e as bandas detectadas por autoradiografia (Mou *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1993; Bauer *et al.*, 1993). Bandas diferenciais foram identificadas visualmente, retiradas do gel e eluídas em água, reamplificadas, clonadas em vetor pMOSBlue (Amersham) e utilizadas na análise de "Northern Blot".

Isolamento de clones de cDNA

Para o isolamento dos clones de cDNA utilizou-se uma biblioteca de cDNA de flor de *Arabidopsis*, gentilmente cedida pelo Dr. Elliot M. Meyerowitz (Caltech-USA), construída em λ -ZAP, Stratagene.

A preparação das placas de lise, a retirada das réplicas em filtros de nylon (Hybond-N, Amersham) e a preparação das membranas seguiu as especificações do protocolo da Stratagene.

O fragmento *EcoR* I/SaI de 1,2 Kb do clone 2.1 obtido a partir de um clone de cDNA isolado da biblioteca de cDNA de flor foi utilizado como sonda no novo “screening” da biblioteca. A sonda foi marcada radioativamente através de reação catalisada pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I pelo método de “random primer” utilizando-se o “kit” MegaPrime DNA Labelling System (Amersham), segundo o protocolo do fabricante. A sonda foi purificada de material radioativo não incorporado em mini-colunas de Sephadex G-50 (Sambrook *et al.*, 1989) e a atividade específica foi determinada após contagem Cerenkov em cintilômetro (LKB Rackbeta). As sondas com atividade específica acima de 10^8 cpm/ μ g de DNA foram utilizadas para a hibridização das membranas.

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de hibridização composta por formamida 50%, SSC 2X (SSC 1X: tampão citrato trissódico 15 mM pH 7,0 com NaCl 150 mM), solução de Denhardt 10X, SDS 1%, Tris-HCl 20 mM pH 7,3 a 42°C durante 2 h e hibridizadas em solução de hibridização durante 16 h a 42°C. As membranas foram lavadas em solução de SSC 2X contendo SDS 0,1% a temperatura ambiente por 30 min, e em solução de SSC 0,2X contendo SDS 0,1% a 42°C por 2 vezes de 10 min e a 65°C por 10 min. As membranas foram então autorradiografadas em Hyperfilm-MP (Amersham). As membranas hibridizadas durante o segundo e terceiro “screenings” foram lavadas em solução de SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente por 2 vezes de 20 min, e em solução de SSC 1X contendo SDS 0,1% a 65°C por 10 min.

Após três “screenings” consecutivos, placas de lise positivas foram isoladas e o plasmídeo pBluescript KS⁻ (Stratagene) foi excisado do vetor Uni-Zap XR utilizando-se o sistema ExAssistTM- SOLRTM (Stratagene) segundo o protocolo do

fabricante. As bactérias SOLR contendo o plasmídeo pBluescript foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina em concentração final de 60 µg/ml de meio, e o DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

Os plasmídeos foram digeridos com *EcoR* I e *Xho* I para a liberação dos insertos e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e analisados através de “Southern blot”.

Seqüenciamento de DNA

As seqüências de DNA foram obtidas com o seqüenciador automático ABI Prism 310 (AppliedBiosystems, Perkin Elmer). Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados de 200 a 500 ng de plasmídeo, 10 pmoles do oligonucleotídeo apropriado e 8 µl do “pré-mix” do kit de seqüenciamento “Dye terminator fluorescent DNA sequencing kit” (Amersham). O PCR foi realizado em aparelho GeneAmp™ 9600 (Perkin Elmer), nas seguintes condições: 1 min de denaturação inicial, e 25 ciclos de 96°C por 30 seg, 45°C por 15 seg, e 60°C por 4 min. Depois da amplificação, a amostra foi precipitada com 7,5 µl de NH₄AcO 7,5 M e 64 µl de etanol absoluto gelado. Depois de seca em SpeedVac, a amostra foi ressuspensa em tampão “formamide gel loading dye” (Amersham) e aplicada no gel de seqüenciamento. As seqüências obtidas foram analisadas nos programas DNASTar e GeneJockey (Macintosh) e posteriormente utilizadas para busca de seqüências similares no banco de dados através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

“Northern blots”

RNA total (10 µg) foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo formaldeído (Sambrook *et al.*, 1989), transferido para membrana de “nylon” (Hybond N⁺, Amersham) por capilaridade em SSC 10X e fixado através de “UV cross linking”, segundo as instruções do fabricante. As membranas de RNA foram hibridizadas com sondas marcadas radioativamente conforme descrito no item “Isolamento de clones de cDNA”. Sondas com atividade específica acima de

10^8 cpm/ μ g de DNA foram utilizadas para a hibridização de membranas. As membranas foram previamente hibridizadas em formamida 50%, SSPE 5X (SSPE 1X: tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4 com NaCl 150 mM e EDTA 1 mM), solução de Denhardt 10X e SDS 1% a 42°C por um período mínimo de 2 horas. A sonda marcada e solução de DNA de esperma de salmão foram denaturadas a 100°C por 5 min e adicionadas à solução de pré-hibridização. A hibridização foi realizada durante a noite a 42°C. As membranas foram lavadas em SSC 2X contendo SDS 0,1% por 2 vezes de 20 min a 42°C, e em SSC 0,2X contendo SDS 0,1% por 10 min a 42°C.

Extração de DNA genômico

DNA genômico foi extraído pelo método de CTAB (Ausubel *et al.*, 1997). Rosetas de plantas de 3 a 4 semanas foram cortadas na base para a obtenção de aproximadamente 6 g de tecido fresco. O material foi congelado e macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino, ao qual foram adicionados 25 ml de CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, sorbitol 140 mM, EDTA 20 mM pH 8,0, NaCl 1,4 M). A mistura foi incubada a 65°C por 20 min, com inversão ocasional. Após o resfriamento da solução foram adicionados 10 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v), o tubo foi invertido cuidadosamente, e a solução permaneceu em agitação leve durante 50 min. As fases foram separadas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 min, e a fase superior aquosa foi transferida para um tubo contendo 17 ml de isopropanol. A solução foi misturada por inversão, e mantida a 4°C por 10 min. O precipitado foi coletado por centrifugação (3.000 rpm por 10 min), seco sobre a bancada e ressuspenso em TE RNase (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0, RNase 20 μ g/ml) em banho a 65°C. A solução foi mantida a 4°C durante 12 h e então extraída duas vezes com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), com agitação por 5 min, duas vezes com clorofórmio, e precipitado com isopropanol. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco a vácuo por 10 min e ressuspenso em 500 μ l de TE em banho a 37°C.

O DNA genômico foi quantificado espectrofotometricamente e através de eletroforese em gel de agarose 0,75%.

“Southern blot”

DNA genômico (10 µg) extraído com CTAB (Ausubel *et al.*, 1997) foi digerido com as enzimas *Xba* I, *Bam*H I e *Eco*R I, por 48 h a 37°C. As reações de digestão continham espermidina em concentração final de 2,5 mM. A digestão do DNA genômico foi acompanhada, através de eletroforese em gel de agarose, de uma alíquota das reações após 24 h de digestão. Ao final da reação, o DNA foi precipitado com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado durante 2 h a -70°C, e a seguir centrifugado a 13.000 rpm por 15 min. O precipitado foi lavado duas vezes em etanol 70%, e ao final ressuspenso em 30 µl de TE.

O produto das digestões foi separado através de eletroforese em gel de agarose 0,75% a 23 V durante a noite. O tratamento do gel e a transferência do DNA para membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) foi realizada seguindo o protocolo do fabricante. A sonda foi marcada através do método de “random primer”. Após a hibridização, a membrana foi lavada em solução de SSC 2X contendo SDS 0,1% por 20 min a 42°C, e a seguir em solução de SSC 0,2 X contendo SDS 0,1% por 20 min a 42°C e por 30 min a 65°C.

Síntese de ribossonda

O fragmento *Eco*R I de 350 pb do clone 3.1 da *MBP 1* foi clonado no sítio *Eco*R I do vetor pBluescript KS⁺ (Stratagene). O DNA plasmidial do transformante T-3 foi purificado através de midipreparação com o Kit Qiagen, seguindo as instruções do fabricante. A orientação do inserto no vetor pKS⁺ foi verificada através de digestão com as enzimas *Sal* I e *Hinc* II e posterior análise dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

A construção pKS/MBP 3.1 *Eco*R I foi linearizada com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III, para dar origem respectivamente às sondas antisense e sense. A eficiência da digestão foi acompanhada através de eletroforese em gel de agarose de alíquotas retiradas das reações. O DNA linearizado foi extraído duas vezes com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e duas vezes com

clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). A seguir, o DNA foi precipitado com acetato de sódio e etanol, e ao final ressuspenso em 10 µl de H₂O livre de RNases. O DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose.

As ribossondas antisense e sense foram sintetizadas *in vitro* por 2 h a 37°C, utilizando-se o sistema de marcação com digoxigenina (DIG)-11-rUTP, seguindo o protocolo do fabricante (Boehringer Mannheim, Germany). As reações continham: 1 µl de DNA linearizado (1 µg/µl), 2 µl de 10 X "DIG labeling mix", 4 µl de tampão de transcrição 5 X, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inibidor de RNA, 2 µl de RNA polimerase (T3 ou T7, para a síntese de sonda antissense ou sense, respectivamente) e 9 µl de H₂O livre de RNases. A eficiência da transcrição foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) de 1 µl de cada reação. O DNA plasmidial foi eliminado da preparação através da adição de 5 µl de tampão de Dnase, 2 µl de inibidor de RNase, 1 µl de DNase I e 22 µl de H₂O livre de RNases. O RNA foi precipitado com 10 µl de acetato de amônio 10 M e 125 µl de etanol absoluto, durante a noite a -20°C. No dia seguinte, a preparação foi centrifugada a 4°C por 14 min, e depois lavada com etanol 70%. O RNA foi seco a temperatura ambiente por alguns minutos, e a seguir ressuspenso em 50 µl de formamida 50%. As ribossondas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% em 0,5 X TBE.

Preparação do tecido

Flores e botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem (ecótipo Columbia Col-0) e mutante *coi1* foram excisadas das plantas e imediatamente submersas em fixador FAA (FAA: etanol 50%, formalina 10% e ácido acético 5%). As amostras foram mantidas em agitação leve durante a noite a 4°C. O FAA foi removido e as amostras incubadas duas vezes por 30 min a temperatura ambiente em etanol 50%. O etanol foi novamente substituído por etanol 50% e as amostras armazenadas a 4°C até a embebição em paraplasto. Paraplasto sólido (Paraplast Plus, Sigma) foi colocado em estufa a 60°C para liquefazer. As amostras foram desidratadas em banhos de 30 min cada em etanol 80%, 90% e

100%. A seguir, foram feitos banhos de 30 min cada em TBA 25% dissolvido em etanol, TBA 50% e TBA 100%. O banho em TBA 100% foi repetido. A maior parte do TBA foi descartada e as amostras foram transferidas para o paraplástico derretido, no qual permaneceram durante a noite a 60°C. O paraplástico foi removido e novo paraplástico adicionado às amostras, que novamente foram incubadas durante a noite a 60°C. Nova troca de paraplástico foi realizada e as amostras foram incubadas a 60°C por 2 horas.

As placas contendo as amostras foram retiradas da estufa e os tecidos separados e posicionados da maneira ideal para os cortes com o auxílio de uma agulha. O paraplástico solidificou a temperatura ambiente e as placas foram armazenadas em recipientes fechados contendo gel de sílica a 4°C.

Preparação das lâminas cobertas com poli-L-lisina

As lâminas foram incubadas durante 30 min a temperatura ambiente em solução de 50 mg/l de poli-L-lisina em Tris-HCl 10 mM pH 8,0. A seguir, foram secas a 37°C em ambiente livre de pó, e devidamente abrigadas a temperatura ambiente até o uso.

Seccionamento dos tecidos em micrótomo

Blocos com as amostras foram cortados com o auxílio de lâmina de bisturi aquecida. Os blocos foram moldados de forma trapezoidal, sendo a face menor a que estava em contato com o fundo da placa. Os blocos trapezoidais foram colocados nos blocos de madeira. Após devida orientação dos blocos com a lâmina do micrótomo, os cortes (8 µm) foram feitos, e as fitas resultantes colocadas em placas de petri de 15 cm, com a face de baixo em contato com a placa.

As lâminas tratadas com poli-L-lisina foram posicionadas em placa calefatora a 42°C e 1 a 2 ml de água destilada degaseificada foram depositados sobre a superfície das lâminas.

As fitas com cortes do tecido foram visualizadas em microscópio óptico, e dessa forma os cortes mais interessantes foram transferidos para a lâmina com o

auxílio de um pequeno bastão de madeira molhado em água. A face de baixo dos cortes entrou em contato com a água, possibilitando que o corte se expandisse. O excesso de água foi retirado com pipeta e as lâminas incubadas sobre a placa calefatora ou em forno de hibridização a 42°C durante a noite. As lâminas foram armazenadas em caixas, com abundante gel de sílica, e fechadas hermeticamente por um tempo máximo de uma semana.

Hibridização *in situ*

Antes da hibridização propriamente dita, as lâminas foram pré-tratadas da maneira como descrito abaixo:

1. As lâminas foram posicionadas no suporte e procedeu-se aos seguintes banhos:

- 2X 10 min em xileno,
- 2X 2 min em etanol 100%,
- 1X 2 min em etanol 90%,
- 1X 2 min em etanol 70%,
- 1X 2 min em etanol 50%,
- 1X 2 min em etanol 30%,
- 2X 2 min em H₂O.

2. Incubação em HCl 0,2 N por 20 min.

3. Lavagem em H₂O por 5 min, eliminação do excesso de H₂O.

4. Incubação em 1 µg/ml de proteinase K em Tris-HCl 100 mM pH 8,0 com EDTA 50 mM, por 30 min.

5. Incubação em PBS 1X (NaH₂PO₄.H₂O 1,6 mM; Na₂HPO₄.2H₂O 8,4 mM; NaCl 0,15 M) por 2 min.

6. Incubação em 2 mg/ml de glicina em PBS 1X por 2 min.

7. Incubação em PBS 1X por 2 X de 30 seg.

8. Incubação em p-formaldeído 4% em PBS 1X

9. Incubação em PBS 1X por 2 X de 2 min.

10. Acetilação com trietanolamina 0,1 M e anidrido acético 1ml/l por 10 min.

11. Incubação em PBS 1X por 2X de 2 min.

12. Desidratação com os seguintes banhos:

1X 2 min em etanol 30%,

2X 2 min em etanol 50%,

1X 2 min em etanol 70%,

1X 2 min em etanol 90%,

2X 2 min em etanol 100%.

13. Secar as lâminas a temperatura ambiente e prosseguir com a hibridização.

As ribossondas antissense-T3 e sense- T7 foram diluídas em tampão de hibridização (formamida 50%, S SC 5 X, SDS 5%, 100 µg/ml de tRNA e 100 µg/ml de poli-A) de forma a obter a concentração de 500 ng de RNA por lâmina. A cada lâmina foram aplicados 100 µl de sonda diluída, e a solução foi coberta cuidadosamente com lamínula. A incubação das sondas foi feita a 53°C durante a noite em ambiente úmido.

As lamínulas foram eliminadas através da submersão das amostras em SSC 0,2 X contendo SDS 0,2%. As lâminas foram mantidas 5 min em SSC 0,2 X contendo SDS 0,2% e então incubadas 2 X de 10 min a 55°C na mesma solução. As amostras foram lavadas em SSC 0,2X contendo SDS 0,2% a temperatura ambiente, e a seguir incubadas em 10 µg/ml de RNase em SSC 2X por 20 min a 37°C. Depois de mantidas em SSC 2X por 2 min a temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas por 5 min em TBS (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 0,4 M) e transferidas para novo TBS por outros 2 min. As amostras foram incubadas por 1 h em solução de bloqueio ("blocking reagent" 0,5% em TBS). Depois do bloqueio, as lâminas foram mantidas em TBS por 1 min para posterior adição do anticorpo.

A cada lâmina foram aplicados 100 µl de anticorpo diluído 1:1000 em BSA 0,5% (p/v) em TBS, e a seguir as amostras foram cobertas com parafilme e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. O parafilme foi retirado, e as lâminas lavadas 3 X em TBS por 2 min cada. Uma incubação de 10 min em tampão de detecção (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 contendo NaCl 100 mM e MgCl₂ 50 mM) foi

efetuada para ativação da fosfatase. O excesso de solução foi retirado e a cada lâmina foram adicionados 200 µl de substrato (338 µg/ml de NBT em formamida 70%, 175 µg/ml de BCIP em formamida, e levamisole 1 mM em água). As lâminas foram incubadas em ambiente úmido a temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte foi verificado o aparecimento de um precipitado azul sobre as amostras, no local aonde a sonda hibridizou com o mRNA do tecido. Os cortes foram então imediatamente fotografados, e a seguir as lâminas permanentes foram montadas.

As amostras foram lavadas em água por 2 X de 5 min cada. A seguir, os cortes foram desidratados em banhos de 2 min cada em etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, e 2 X de 2 min em xilol. Histovitrex foi então utilizado para cobrir as lâminas.

O controle positivo de hibridização incluído nesses experimentos foi a utilização da sonda antisense correspondente ao cRNA de histona H3 de milho, sintetizada pelo Dr. Marcelo Menossi.

Construção de vetores para transformação de *Agrobacterium*

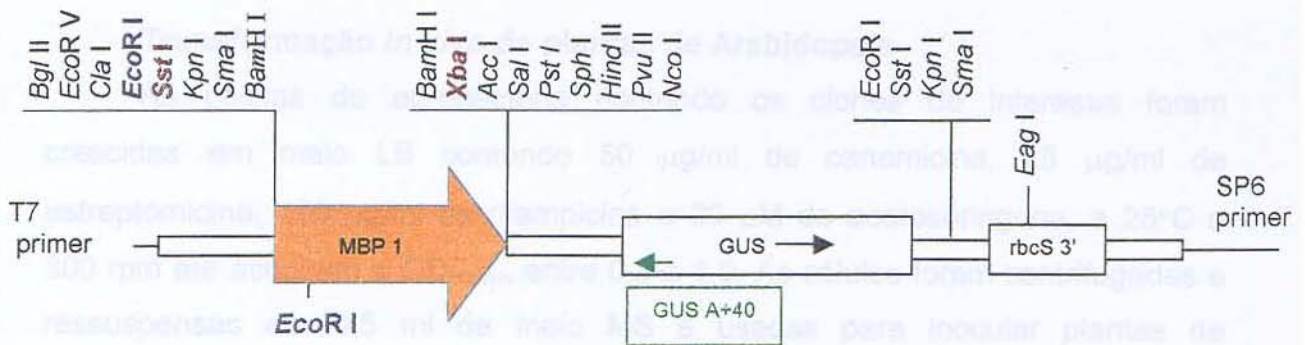
O cDNA correspondente ao gene *MBP1* foi amplificado através de reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos que possibilitaram a inserção do sítio da enzima de restrição *BamH* I nas extremidades 5' (MBP Bam 5' GGCTGCAGGATCCCGGCACG 3') e 3' (MBP Bam2 5' CACCCGGATCCATAAGCATG 3') do clone. O produto de PCR foi separado através de eletroforese em gel de agarose 1%, extraído do gel e purificado com o kit Qiagen. A seguir, o fragmento foi clonado em pGEM T-Easy (Promega), liberado do vetor pela digestão com *BamH* I e clonado no sítio *BamH* I do vetor pDMC 200 (CAMBIA). O DNA plasmidial dos transformantes obtidos foi digerido com *EcoR* I para a verificação da orientação do inserto no vetor pDMC 200. A seguir, o DNA plasmidial foi digerido com *Sst* I e *Xba* I e clonado nos mesmos sítios do vetor pBI121 (Clontech), dando origem ao vetor pBI MBP 1 antisense ou sense (Fig. 4).

Devido à baixa frequência de clones transformantes pDMC 3.1 BamHI com orientação antisense (analisados por eletroforese em gel de agarose), foi necessária a análise de um número maior de transformantes. Colônias de *E. coli* DH5 α obtidas após transformação com a ligação do inserto 3.1 BamHI ao vetor pDMC 200 foram retiradas da placa de LB com o auxílio de um bastão de madeira. O bastão foi depositado em um tubo de microcentrífuga contendo 0,5 ml de H₂O Milli Q e agitado vigorosamente, depois colocado em meio LB para propagação da colônia. O tubo de microcentrífuga foi aquecido a 96°C, centrifugado para precipitar restos celulares, e uma alíquota de 5 μ l de sobrenadante foi utilizada em reação de PCR com um oligonucleotídeo interno ao clone de cDNA (RACEMY 3', 5' CTGGGAAGTGTGTTTGTGG 3') e com o oligonucleotídeo GUS A+40 (5' GAGCTGCCGGACACCCGTAAGTCA 3'). Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose, e os clones que originaram fragmentos de 400 pb foram selecionados. O DNA plasmidial dos transformantes selecionados foi digerido com Sst I e Xba I e clonado nos mesmos sítios do vetor pBI121, dando origem ao vetor pBI MBP 1 sense (Fig. 4).

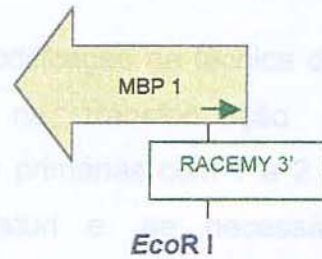
Transformação de agrobactérias

Clones pBI MBP 1 sense e antisense foram usados para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404), as quais foram incubadas a 37°C por 5 min com 1 μ g de plasmídeo. As células foram crescidas em meio LB a 28°C por 3 h a 280 rpm, e plaqueadas em LB contendo 50 μ g/ml de canamicina e 25 μ g/ml de estreptomicina. As colônias transformantes foram crescidas em meio LB líquido contendo 50 μ g/ml de canamicina, 25 μ g/ml de estreptomicina e 100 μ g/ml de rifampicina. O DNA plasmidial foi extraído das agrobactérias transformadas segundo Hooyakaas (1988), digerido com EcoR I e submetido a análise de "Southern blot" para confirmação da transformação.

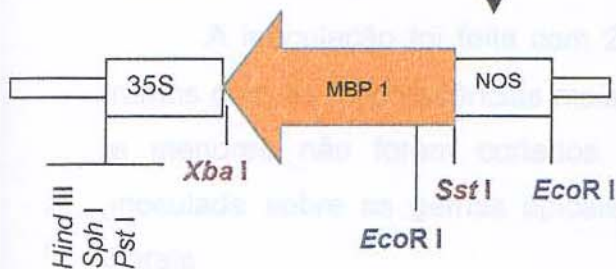
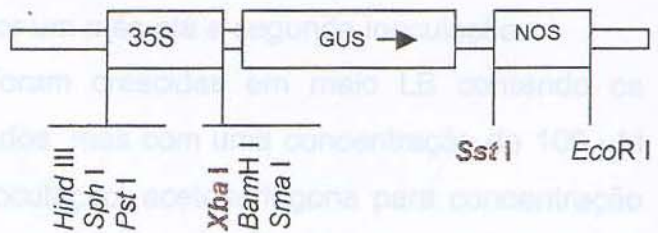
(A) pDMC 3.1 BamHI sense



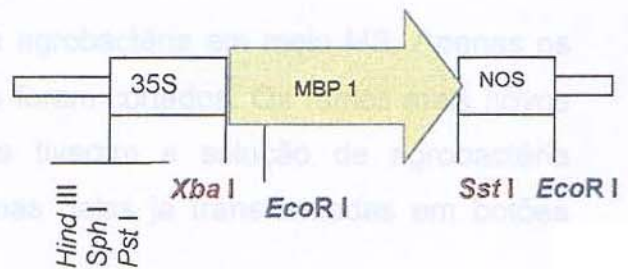
(B) pDMC 3.1 BamHI anti



pBI121



(A) pBI MBP 1 anti



(B) pBI MBP 1 sense

Figura 4- Esquema das construções antisense (A) e sense (B) utilizadas para a transformação de plantas de *Arabidopsis*. As setas  e  indicam o sentido de transcrição da MBP 1. O sentido da transcrição do gene GUS também está indicado por uma seta (). As enzimas *EcoR* I destacadas em azul foram utilizadas nas verificações da orientação dos clones em seus vetores, e as enzimas *Xba* I e *Sst* I (em vermelho) foram usadas na clonagem direcional em pBI121. Os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para seleção de transformantes na orientação antisense estão destacados em verde.

Transformação *in vivo* de plantas de *Arabidopsis*

As células de agrobactéria contendo os clones de interesse foram crescidas em meio LB contendo 50 µg/ml de canamicina, 25 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de rifampicina e 20 µM de acetoseringona, a 28°C a 300 rpm até atingirem a OD_{600nm} entre 0,8 e 1,0. As células foram centrifugadas e ressuspensas em 0,5 ml de meio MS e usadas para inocular plantas de *Arabidopsis*.

Uma modificação da técnica de transformação *in vivo* (Chang *et al.*, 1994) foi utilizada na transformação de plantas selvagens de *Arabidopsis*. Inflorescências primárias com 1 a 2,5 cm de altura foram cortadas na base com auxílio de bisturi e, se necessário, o excesso de exudato foi retirado cuidadosamente com gaze. A região do corte foi inoculada com 20 µl de uma solução de agrobactéria em meio MS, e as plantas foram mantidas na câmara de crescimento (20-22°C e 16h de luz) por um mês até a segunda inoculação.

As células de agrobactéria foram crescidas em meio LB contendo os mesmos antibióticos acima mencionados, mas com uma concentração de 100 µM de acetoseringona. Após 16 h da inoculação, acetoseringona para concentração de 100 µM foi acrescentada ao meio, e as células foram crescidas por mais 2 h antes da inoculação.

A inoculação foi feita com 20 µl de agrobactéria em meio MS. Apenas os ramos com as inflorescências mais velhas foram cortados. Os ramos mais novos e menores não foram cortados, apenas tiveram a solução de agrobactéria inoculada sobre as gemas apicais, algumas delas já transformadas em botões florais.

As plantas foram mantidas na câmara de crescimentos até a coleta das sementes F1, que foram armazenadas a 8 °C e posteriormente selecionadas em meio MS contendo 100 µg/ml de canamicina.

Técnicas padrões em biologia molecular

As técnicas padrões de biologia molecular, como eletroforese em gel de agarose ou poli(acrilamida), digestão enzimática de fragmentos de DNA,

purificação e clonagem de fragmentos de DNA, transformação de células de *E. coli*, marcação de sondas radioativas, foram feitas como descrito em Sambrook e colaboradores (1989).

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *GAPB*

Resultados e Discussão

O objetivo do nosso grupo é investigar os mecanismos de ação do ácido jasmônico e da fitotoxina coronatina em plantas de *Arabidopsis*. Para tanto, iniciamos um estudo de identificação de genes que fossem rapidamente induzidos ou reprimidos por esses compostos, ou em resposta a machucado, ou ainda expressos diferencialmente em flores de plantas selvagens em comparação com flores macho-estéreis do mutante *coi1*. As plantas *coi1* foram utilizadas como controle por serem insensíveis ao tratamento com coronatina ou ácido jasmônico. Empregamos a técnica de “differential display” de mRNA para isolamento das mensagens a serem analisadas.

No início do trabalho realizamos dois experimentos de “differential display” com cDNAs obtidos a partir de mRNA de plântulas selvagem e mutante *coi1* tratadas ou não com coronatina, e de mRNA de flores. A figura 5 mostra um gel de “differential display” de fragmentos de DNA obtidos com diferentes combinações de oligonucleotídeos. Várias bandas diferenciais foram identificadas e isoladas. O DNA das bandas foi eluído em água, reamplificado por PCR e separado por eletroforese em géis de agarose. As bandas de DNA que correspondiam ao peso molecular determinado no gel de “differential display” foram isoladas, e purificadas da agarose com o uso de “SephaglasTM BandPrep Kit” (Pharmacia Biotech) seguindo o protocolo do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram quantificados e utilizados na marcação de sondas em experimentos de “Northern blot”. As membranas foram preparadas com RNA total extraído de plântulas selvagem e *coi1* tratadas com coronatina ou metil jasmonato, e de flores de plantas selvagem e mutante. Escolhemos, para caracterização, uma das mensagens cuja expressão diferencial foi confirmada através de “Northern blot”.

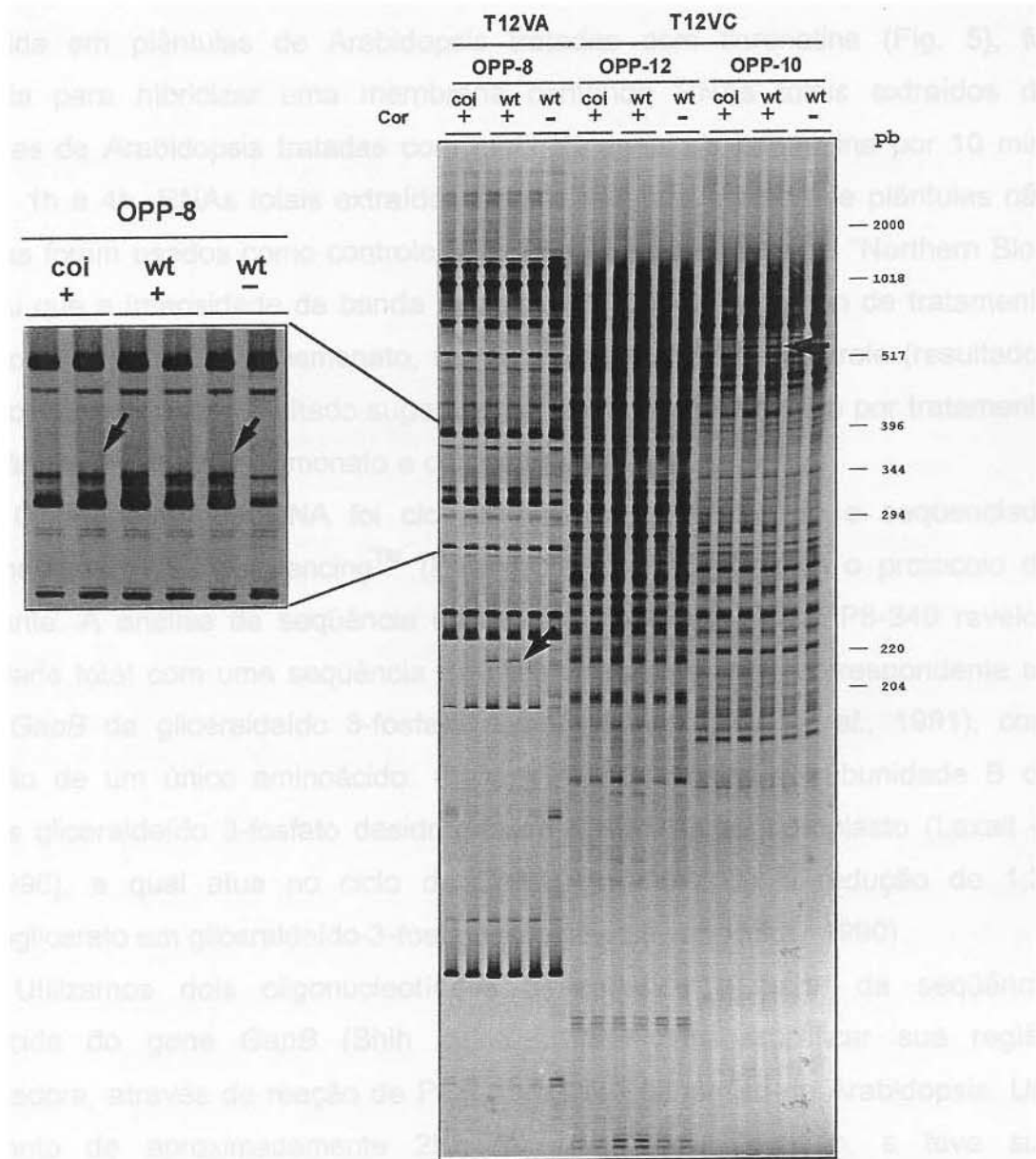


Figura 5- Gel de “differential display” mostrando fragmentos de DNA gerados após PCR com diferentes combinações de oligonucleotídeos. Setas indicam bandas diferenciais identificadas entre plântulas de *Arabidopsis* selvagem (wt) e mutante *coi1* (*coi*), tratados ou não com coronatina (Cor). A concentração final dos oligonucleotídeos ancoradores (T₁₂VN) e arbitrários (OPP_) na reação de PCR é de 1 μ M. Reação de PCR: denaturação inicial a 94°C por 2 min; 40 ciclos: denaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 40°C por 2 min, e extensão a 72°C por 30 seg; extensão adicional a 72°C por 5 min.

A sonda TVAOPP8-340, proveniente de uma banda identificada como reprimida em plântulas de *Arabidopsis* tratadas com coronatina (Fig. 5), foi utilizada para hibridizar uma membrana contendo RNAs totais extraídos de plântulas de *Arabidopsis* tratadas com metil jasmonato e coronatina por 10 min, 30min, 1h e 4h. RNAs totais extraídos nesses mesmos tempos de plântulas não tratadas foram usados como controle. A análise densitométrica do "Northern Blot" revelou que a intensidade da banda diminuiu em função do tempo de tratamento com coronatina ou metil jasmonato, mantendo-se estável no controle (resultados não mostrados). Esse resultado sugeriu a repressão da mensagem por tratamento das plântulas com metil jasmonato e coronatina.

O fragmento de DNA foi clonado em vetor pMOSBlue e seqüenciado utilizando-se o kit ¹⁷Sequencing™ (Pharmacia), de acordo com o protocolo do fabricante. A análise da seqüência de 280 pb do clone TVAOPP8-340 revelou identidade total com uma seqüência de cDNA de *Arabidopsis* correspondente ao gene *GapB* da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Shih *et al.*, 1991), com exceção de um único aminoácido. O gene *GapB* codifica a subunidade B da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de cloroplasto (Laxalt *et al.*, 1996), a qual atua no ciclo de Calvin, promovendo a redução de 1,3-difosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato (Mathews e van Holde, 1990).

Utilizamos dois oligonucleotídeos desenhados a partir da seqüência conhecida do gene *GapB* (Shih *et al.*, 1991) para amplificar sua região codificadora, através de reação de PCR com DNA genômico de *Arabidopsis*. Um fragmento de aproximadamente 2Kb foi amplificado, clonado, e teve sua extremidade 5' seqüenciada. A seqüência obtida apresentou identidade total com o gene *GapB* de *Arabidopsis*. O clone genômico foi utilizado como sonda em experimentos de "Northern blot". Entre três experimentos realizados com tratamento de plântulas selvagens e mutantes com coronatina e MeJA, dois mostraram uma diminuição do transcrito correspondente ao gene *GapB* em função do tempo de tratamento, que variou de 10 min a 8 h (um exemplo está mostrado na Fig. 6). No entanto, em um dos experimentos não foi possível observar a

repressão da transcrição do gene, gerando dúvidas em relação à veracidade dos outros resultados.

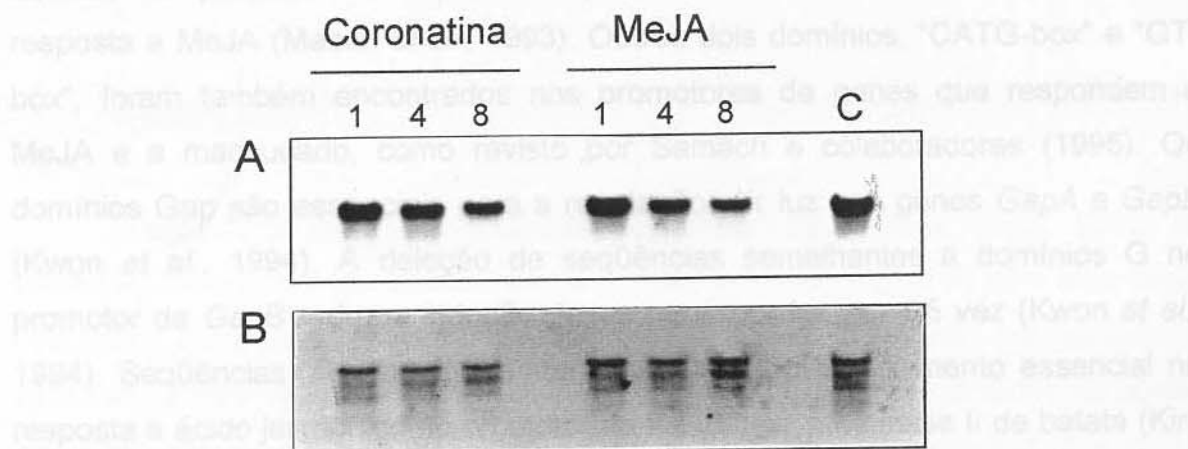


Figura 6- "Northern blot" de RNA total extraído de plântulas tratadas com MeJA ou coronatina por 1, 4 e 8 horas. **A.** Membrana hibridizada com a sonda *GapB*, revelando que os níveis dos transcritos diminuem ao longo do tempo dos tratamentos. **B.** Membrana hibridizada com a sonda *Ubiquitina* de tabaco, mostrando que quantidades equivalentes de RNA foram aplicadas no gel em cada um dos tratamentos e no controle (C). O controle representa RNA total extraído de plântulas de *Arabidopsis* não tratadas.

Os jasmonatos estão envolvidos na repressão de genes relacionados ao processo de fotossíntese, como acontece com o gene *RBCL* (subunidade maior da rubisco), *CAB* (proteína ligante à clorofila a e b) e proteínas do fotossistema II de cevada (Reinbothe *et al.*, 1994). Possivelmente existe um mecanismo de repressão, coordenado por ácido jasmônico, de genes relacionados à fotossíntese. O gene *CO11*, que participa de processos regulados por jasmonatos (Xie *et al.*, 1998), poderia estar seqüestrando os reguladores de genes envolvidos em fotossíntese em plantas de *Arabidopsis*. A investigação da expressão de *GapB* em diferentes tecidos das plantas selvagens e mutantes mostrou que a transcrição do gene não é afetada pelo gene *CO11*. Além disso, os resultados obtidos nas análises de plântulas tratadas com coronatina ou MeJA não foram conclusivos para estabelecer a regulação de *GapB* por jasmonatos.

Dewdney e colaboradores (1993) mostraram que os genes *GapA* e *GapB* de *Arabidopsis* são regulados por luz. A análise do promotor do gene *GapB* (Kwon *et al.*, 1994) revela a existência de elementos presentes em genes regulados por

ácido jasmônico e por luz. O domínio “CT-box” encontrado na posição –547 foi definido no promotor da *vspB* de soja como um domínio importante para a resposta a MeJA (Mason *et al.*, 1993). Outros dois domínios, “CATG-box” e “GT-box”, foram também encontrados nos promotores de genes que respondem a MeJA e a machucado, como revisto por Samach e colaboradores (1995). Os domínios Gap são essenciais para a regulação por luz nos genes *GapA* e *GapB* (Kwon *et al.*, 1994). A deleção de seqüências semelhantes a domínios G no promotor de *GapB* reduz a indução desse gene por luz em 1,5 vez (Kwon *et al.*, 1994). Seqüências “G box” foram identificadas como um elemento essencial na resposta a ácido jasmônico no promotor de inibidor de proteinase II de batata (Kim *et al.*, 1992) e de *vspB* de soja (Mason *et al.*, 1993). Seqüências “G-box” e seqüências com substituição em apenas 1 ou 2 nucleotídeos (“G-box-like”) foram identificadas no promotor de genes que são ativados por luz, como *cab-E* de *Nicotiana plumbaginifolia* e chalcona sintetase de *Petroselinum crispum* e *Antirrhinum majus* (Schindler *et al.*, 1992). Os elementos “G-box” estão portanto presentes em promotores de genes que respondem à luz e ao ácido jasmônico. No caso do gene *GapB*, algum tipo de interação entre esses dois estímulos poderia ocorrer, de tal forma que a repressão do gene inicialmente observada por MeJA poderia ser “anulada” pelas condições de luz utilizadas no crescimento das plantas. Lillo (1993) mostrou a ocorrência de variações diurnas nos níveis de mRNA e de atividade enzimática da GAPDH de cloroplasto de plântulas de milho, em respostas a ciclos de luz:escuro.

Os experimentos de “Northern blot” com o gene *GapB* não foram conclusivos em relação à repressão do gene por jasmonatos, e tendo em vista a interferência da luz e do ritmo circadiano na expressão da GAPDH, resolvemos interromper o trabalho e nos dedicar ao estudo de uma mensagem diferencial expressa em flores de *Arabidopsis*. Uma vez que ácido jasmônico é capaz de exercer regulação pós-transcricional de genes codificadores de proteínas envolvidas em fotossíntese (Reinbothe *et al.*, 1994b, 1993a e 1993b), a determinação da atividade de GAPDH em tecidos tratados ou não com MeJA ou coronatina é um aspecto interessante a ser abordado em trabalhos futuros.

Resultados

Utilizando a técnica de “differential display” de mRNAs, o Dr. Celso E. Benedetti isolou uma banda de 120 pb (TVGOPP9-120, Figura 7) com expressão diferencial em flores selvagens. O fragmento de DNA foi clonado, seqüenciado e utilizado na hibridização de membranas contendo RNAs totais extraídos de flores. Um transcrito de ~1,8 kb foi detectado apenas em flores de plantas selvagens, mas não em flores macho estéreis do mutante *coi1*. O fragmento foi utilizado no “screening” de uma biblioteca de cDNA de flor, e três clones independentes foram isolados. As extremidades dos clones foram seqüenciadas e um deles era quimérico (com cauda poli-A nas duas extremidades). Os outros dois clones, 1.1 e 2.1, foram utilizados como sondas em “Northern blots” (Figura 1, artigo), e detectaram transcritos de ~1,8 kb e ~1,7 kb, ~1,8 kb e ~2,8 kb, respectivamente.

Com o objetivo de isolar o transcrito maior de ~2,8 kb, utilizamos um fragmento *EcoR* I/*Sa* I de 1,2 kb do clone 2.1 no “screening” da biblioteca de cDNA de flor. Vinte e um clones independentes de fago λ foram isolados após 3 “screenings” consecutivos da biblioteca. Plasmídeos pBlueScript recombinantes correspondentes a cada um dos clones foram excisados e utilizados na análise de “Southern blot” e seqüenciamento.

Os plasmídeos purificados foram digeridos com *EcoR* I e *Xho* I para a liberação dos insertos. Os insertos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e analisados por “Southern blot”. A figura 8 mostra o padrão de restrição dos clones e a hibridização dos insertos com a sonda utilizada no “screening”.

Através da comparação do padrão de restrição e de hibridização dos clones (Fig. 6), foram identificados aproximadamente 14 padrões de restrição diferentes. Um representante de cada grupo foi escolhido para o seqüenciamento, e dois clones homólogos às proteínas ligantes de mirosinase (“myrosinase-binding

proteins” ou MBPs) foram identificados. A caracterização dos clones *MBP1* e *MBP2* está descrita no artigo apresentado a seguir.

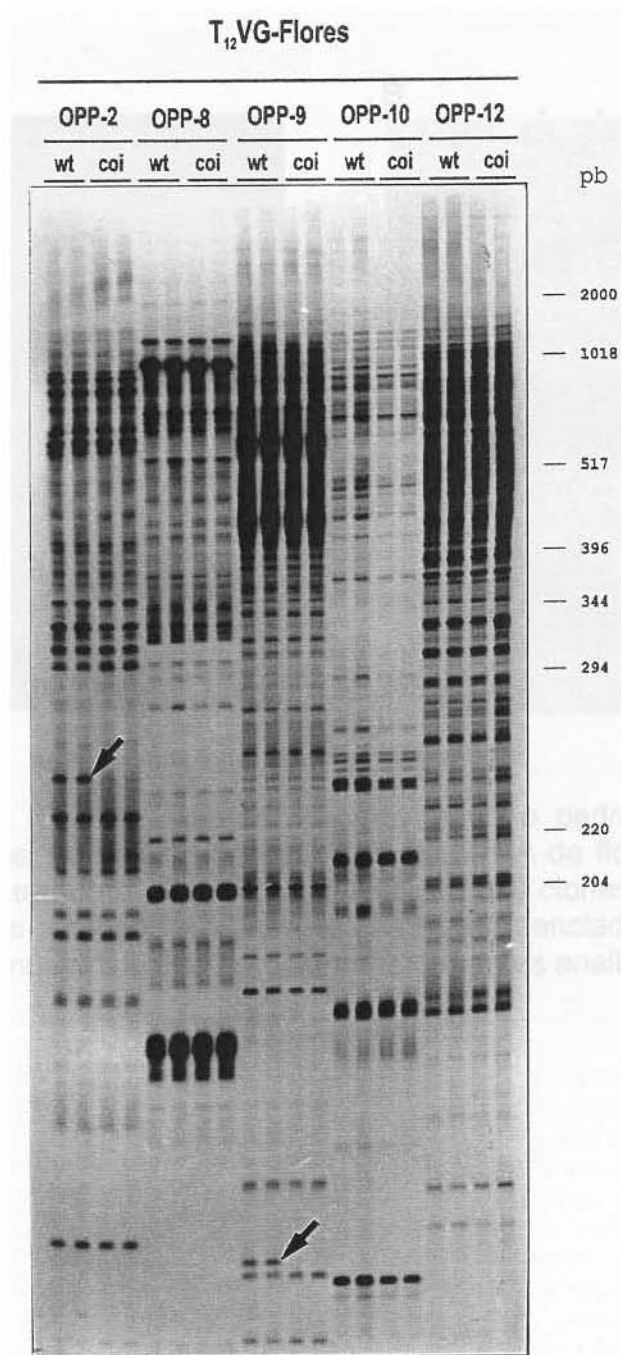


Figura 7- Gel de “differential display” mostrando fragmentos de DNA gerados após PCR com diferentes combinações de oligonucleotídeos. Setas indicam bandas diferenciais identificadas entre flores de *Arabidopsis* selvagem (wt) e mutante *coi1* (coi). A concentração final dos oligonucleotídeos ancoradores (T₁₂VN) e arbitrários (OPP_) na reação de PCR é de 1 μ M. Reação de PCR: denaturação inicial a 94°C por 2 min; 40 ciclos: denaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 40°C por 2 min, e extensão a 72°C por 30 seg; extensão adicional a 72°C por 5 min.

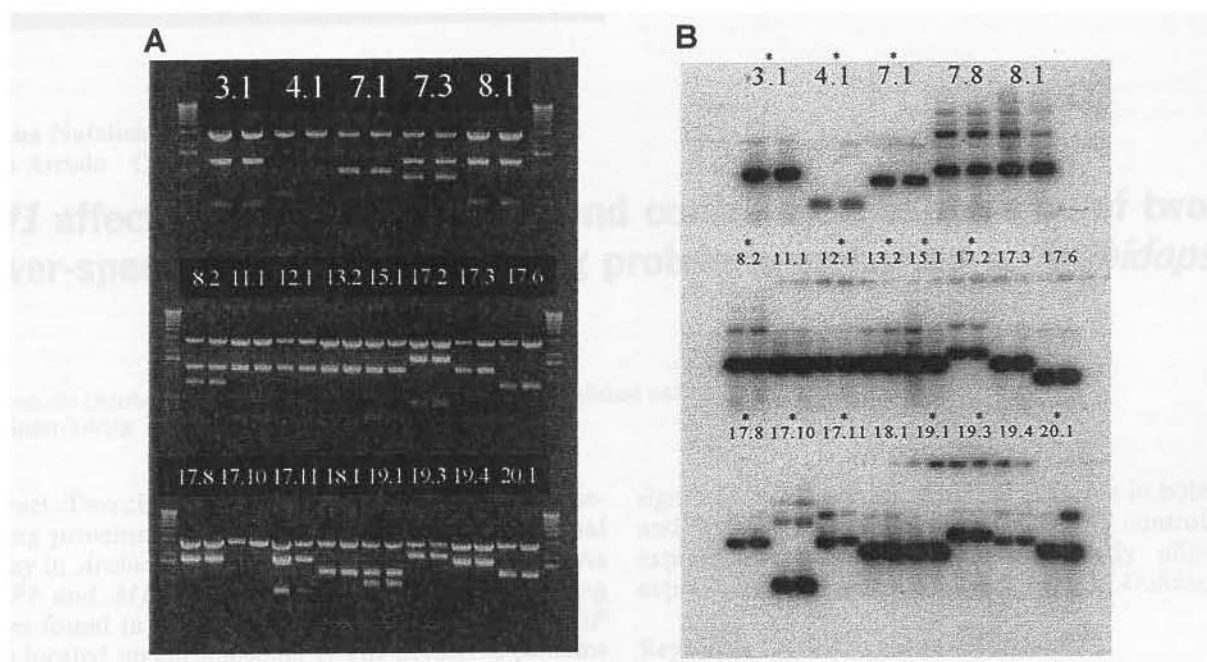


Figura 8- **A.** Gel de agarose 1% mostrando o padrão de restrição dos clones isolados após “screening” da biblioteca de cDNA de flor de Arabidopsis. **B.** “Southern blot” mostrando o padrão de hibridização dos clones com a sonda *EcoR* I/*Sa* I de 1,2 kb. Os asteriscos indicam os clones seqüenciados. Cada clone está identificado por um número acima de dois transformantes analisados.

Adriana Natalício Capella · Marcelo Menossi
Paulo Arruda · Celso Eduardo Benedetti

COI1* affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis

Received: 30 October 2000 / Accepted: 17 December 2000 / Published online: 25 April 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract Two cDNA clones homologous to myrosinase-binding proteins (MBPs) were identified by differential display in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. The cDNAs (*MBP1* and *MBP2*) correspond to two open-reading frames found in a gene cluster of seven putative *MBP* genes located on chromosome 1. The predicted proteins *MBP1* and *MBP2* are similar to lectins and plant aggregating factors. In addition, *MBP2* contains a region of high content of proline and alanine residues, commonly found in arabinogalactan proteins and hydroxyproline-rich glycoproteins. Transcripts corresponding to *MBP1* and *MBP2* genes are exclusively and abundantly expressed in flowers but are not detected in male-sterile flowers of *coil* plants, insensitive to jasmonic acid. Northern analysis and in situ hybridization revealed that *MBP* mRNAs are present in higher levels in immature flowers and are localized in several floral organs, including the ovary, ovules, style, anthers and filament. Transcripts of the *Arabidopsis* myrosinase gene *TGG1* show a pattern of expression similar to that observed for the *MBP* genes during flower development; however, they are also abundant in green tissues and are only partially affected by *COI1*. Crude preparations of soluble proteins from leaf and flower extracts of wild-type *Arabidopsis* showed myrosinase activity when sinigrin was used as substrate. In contrast, *coil* plants showed

significantly reduced myrosinase activities in both leaves and flowers. The results show that *COI1* controls *MBP* expression in flowers and significantly affects the expression and activity of myrosinase in *Arabidopsis*.

Keywords *Arabidopsis* (*Coil* mutant) · Differential display · Flower-specific expression · Mutant (*Coil*) · Myrosinase-binding proteins

Abbreviations EST: expressed sequence tag · JA: jasmonic acid · MBP: myrosinase-binding protein · MeJA: methyl jasmonate

Introduction

The *coil* mutant of *Arabidopsis* is insensitive to jasmonic acid (JA) and produces male-sterile flowers (Feys et al. 1994). We have used this mutant to identify JA-responsive genes, and this allowed us to isolate various genes that are normally up-regulated in *Arabidopsis* leaves by JA or wounding. We have noticed that all JA-induced genes we have isolated are constitutively expressed in flowers, but are not found in roots. Examples include the vegetative storage protein gene *VSP* (Benedetti et al. 1995), the coronatine-induced gene *ATHCOR1* (Benedetti et al. 1998) and the oxophytodienoate reductase gene *OPR3* (Costa et al. 2000). In this study, we compared the gene expression profiles of normal and male-sterile flowers of *coil*, to identify flower-specific genes dependent on JA signal transduction. We report the isolation and characterization of two *Arabidopsis* genes that are specifically expressed in floral organs but are not inducible by JA or wounding in vegetative tissues. The genes identified are homologous to those for myrosinase-binding proteins (MBPs) commonly found in association with myrosinase enzymes in various members of the Brassicaceae.

The myrosinase-glucosinolate system is involved in several aspects of plant development and defense, affecting the behavior of herbivorous insects and

EMBL accession numbers: *MBP1* (AF054906), *MBP2* (AF222537)

A.N. Capella · M. Menossi · P. Arruda · C.E. Benedetti (✉)¹
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética,
Universidade Estadual de Campinas, P.O. Box 6010,
CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

M. Menossi · P. Arruda
Departamento de Genética e Evolução,
Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas,
CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Present address:

¹Centro de Biologia Molecular Estrutural,
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron,
Campinas, CP6192, CEP 13084-971, Brazil
e-mail: celso@lnls.br
Fax: +55-19-32877110

pathogens (reviewed by Rask et al. 2000). In this system, hydrolysis of the glucosinolates by myrosinase enzymes (thioglucosidases) produces substances with a remarkably wide spectrum of biological activities. Some of these compounds are very effective against chewing insects, bacteria and fungi, whereas others can function as signaling molecules or stimulants for insect feeding and oviposition (Rask et al. 2000). Additionally, glucosinolates and their degradation products can provide precursors of plant hormones and serve as metabolic sources of sulfur and nitrogen at particular stages of the plant development (Bones and Rossiter 1996).

The function of MBPs in plants has not been established, and it is not clear yet whether they have a role in the myrosinase-glucosinolate system, since recombinant myrosinases display normal activity in the absence of MBPs or other myrosinase-associated proteins (Chen and Halkier 1999). It has been demonstrated that certain types of myrosinase-associated proteins called epithiospecifiers (ESPs) function as a myrosinase co-factor necessary to modulate the specificity of myrosinases towards the production of particular enzyme products (Bones and Rossiter 1996; Chen and Halkier 1999; Bernardi et al. 2000). However, experimental data supporting a relationship between MBPs and ESPs are still lacking (Bones and Rossiter 1996). Due to their lectin activity, it has also been suggested that MBPs could bind carbohydrates present in insect guts and fungal pathogens, thus enhancing the action of glucosinolates in defense reactions (Rask et al. 2000).

Three myrosinase genes have been identified in *Arabidopsis*, two of them, *TGG1* and *TGG2*, present conserved structures and very similar expression patterns (Xue et al. 1995). We chose myrosinase *TGG1* to compare its transcript levels relative to the *MBP* genes in vegetative tissues and during flower development. Here, we report that myrosinase *TGG1* and *MBP* genes are expressed in flowers in a developmentally similar way, and that *COI1* is also important for *TGG1* expression and myrosinase activity in *Arabidopsis*.

Materials and methods

Plant growth

Seeds of wild-type *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Columbia (Col-0) were germinated in MS medium (Murashige and Skoog 1962), whereas *coil* seeds from an F₂ population segregating for the *Coi* phenotype, were first germinated in MS containing 10 μ M methyl jasmonate (MeJA) to select homozygous *coil* plants (Feys et al. 1994). Seedlings were grown for about 10 days in a growth cabinet under white light (70 μ mol photons m⁻² s⁻¹) with a 16-h-day/8-h-night photoperiod at 20 °C, and then transferred to fresh MS medium and grown for 5 days. Seedlings were either transferred to fresh MS or MS-MeJA plates, or moved to soil to grow to maturity.

Differential display

Differential display of mRNA was performed based on Liang and Pardee (1992). Total RNA (1 μ g) from flowers of wild-type and

coil plants was reverse-transcribed and amplified by polymerase chain reaction (PCR) as previously described (Benedetti et al. 1998). A differentially displayed band of about 120 bp (TVGOPP9), detected by the pair of primers OPP9 (OPERON, Alameda, Calif., USA) and T₁₂VG (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA), was purified, cloned and sequenced as described by Benedetti et al. (1998), and used to probe RNA blots.

Screening of the cDNA library

A cDNA library of *Arabidopsis* (*Landsberg erecta*), kindly donated by Dr. Elliot M. Meyerowitz (California Institute of Technology, Pasadena, USA), was screened following the Stratagene protocols using TVGOPP9 as probe. A few independent clones were isolated and sequenced using the dye-terminator reaction kit (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., USA) in an automated ABI DNA sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK). A 1.2-kb *EcoRI*/*Sall* fragment from clone 1.2 isolated during the first screening was used to re-screen the library. Two full-length clones of approx. 1.6 kb (*MBP1*) and approx. 2.4 kb (*MBP2*) were used in the work described here.

Probes

Specific probes were obtained by digesting *MBP1* and *MBP2* cDNAs with *EcoRI* or *EcoRI/SspI*, yielding the 286-bp *EcoRI* and 571-bp *EcoRI/SspI* fragments, corresponding to the 5' ends of *MBP1* and *MBP2*, respectively. The 286-bp *EcoRI* fragment was subcloned into pBlueScript KS⁺ (pMBP1Eco) to generate the sense and antisense RNA probes used in the *in situ* hybridization. A myrosinase probe was obtained from the expressed sequence tag (EST) number 34862 (clone 185J2T7) corresponding to the myrosinase *TGG1* gene, provided by the *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio State University). The identity of the EST clone was confirmed by sequencing analysis.

Northern blots

Total RNA from roots, seedlings, leaves, flowers and siliques was extracted according to Verwoerd et al. (1989), whereas total RNA from flowers at different developmental stages was extracted with Trizol reagent (GIBCO-BRL) following the manufacturer's protocol. Aliquots of total RNA (20 μ g) were fractionated on formaldehyde-agarose gels (Sambrook et al. 1989), transferred onto nylon membranes Hybond N⁺ (Amersham, Little Chalfont, UK) by capillary blotting and fixed by UV cross-linking according to the manufacturer instructions. Blots were hybridized overnight with the ³²P-labeled probes described above, at 42 °C, and washed twice for 10 min at 42 °C with 2 $\times$ SSC (1 $\times$ SSC is 0.15 M sodium chloride, 0.015 M sodium citrate, pH 7) and 0.1% SDS, and twice with 0.2 $\times$ SSC and 0.1% SDS, under the same conditions.

Southern blots

Genomic DNA was extracted using the CTAB method described in Ausubel et al. (1989). DNA samples (10 μ g) were digested with *XbaI*, *XhoI* or *EcoRI*, electrophoresed in a 1% agarose gel and transferred onto nylon membranes (Hybond N⁺). Blots were hybridized for 15 h at 42 °C with the ³²P-labeled MBP1- and MBP2-specific probes described above. Membranes were washed once with 2 $\times$ SSC and 0.1% SDS for 20 min at 42 °C, and twice with 0.2 $\times$ SSC containing 0.1% SDS for 10 min at 42 °C.

In situ hybridization

RNA probes were prepared from linearized pMBP1Eco using digoxigenin (DIG)-11-rUTP labeling, following the manufacturer's protocol (Boehringer Mannheim, Germany), except that T3 RNA

polymerase was used. Tissues were fixed in FAA (50% ethanol, 10% formaldehyde, 5% acetic acid) overnight at 4 °C, dehydrated through a graded ethanol series followed by a *t*-butanol series, then embedded in Paraplast Plus (Sigma, St. Louis, MO, USA) and sectioned (8 µm). Sections assembled in poly-L-lysine-coated slides were de-paraffinized in xylene, re-hydrated and treated with proteinase K (1 µg/ml) for 30 min. Slides were incubated in 100 mM triethanolamine, 0.1% acetic anhydride for 10 min. Hybridization was carried out at 55 °C in a moist chamber in 50% deionized formamide, 5× SSC, 5% SDS, 100 µg/ml tRNA, 100 µg/ml polyA and the probes at 5 µg/ml. Slides were washed twice in 0.2× SSC, 0.2% SDS at 55 °C for 10 min, and then incubated with RNase A (10 µg/ml) for 20 min. Immunological detection was performed incubating the slides for 1 h in 0.5% blocking reagent, then in diluted anti-DIG-alkaline phosphatase conjugate (1:1,000) in 0.5% BSA for 1 h at room temperature in a moist chamber. The color reaction was developed in 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 338 µg/ml nitro blue tetrazolium (NBT), 175 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), and 1 mM levamisole, overnight at room temperature in a dark moist chamber. Sections were dehydrated in ethanol series and mounted with Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) for visualization.

Protein extraction and myrosinase assay

Rosette leaves and flowers of wild-type and *coil* plants were homogenized in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 5 mM benzimidazole. The homogenate was maintained in continuous, gentle stirring for 30 min at 4 °C. Insoluble material was removed by centrifugation at 13,000 rpm for 15 min, and the supernatant was filtered through a 0.45-µm filter and precipitated in 70% saturated ammonium sulfate. The pellet was dissolved in 10 mM phosphate buffer, and thoroughly dialyzed against the same buffer. Precipitate formed during dialysis was removed by centrifugation at 4,000 g for 10 min. All steps were carried out at 4 °C. Myrosinase activity was determined by measuring the hydrolysis of sinigrin (Sigma) by following the decrease in absorbance at 227 nm (Schwimmer 1961). Assays were performed at 27 °C in 0.75 ml of 33 mM sodium phosphate (pH 6.0), containing 20–50 µg of protein extract and 0.24 mM sinigrin. Assuming that one of the hydrolytic products of sinigrin, allyl isothiocyanate, absorbs light in the UV region, we used the molar extinction coefficient at 227 nm for both the substrate ($\epsilon = 7800$) and product ($\epsilon = 564$) in the calculation of sinigrin concentration at the end of the reaction. Protein was quantified by a Bradford-based method (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA).

Results

Isolation of two *MBP* genes from *Arabidopsis* flowers

A small DNA fragment (TVGOPP9) identified by differential display in the wild type but not in male-sterile flowers of *coil* was cloned and used to probe total RNA from immature and developed flowers of *Arabidopsis*. It was found that TVGOPP9 detected a transcript of approx. 1.8 kb expressed only in wild-type flowers (not shown).

A flower cDNA library was screened with TVGOPP9 and a few independent clones were isolated. Sequence analysis of the cDNA ends revealed that two of the clones (1.1 and 1.2) were related and that clone 1.1 contained the entire TVGOPP9 sequence located at its 5' end. Northern blot analysis showed that, similar to TVGOPP9, clone 1.1 preferentially detected a transcript

of approx. 1.8 kb, whereas clone 1.2 detected transcripts of approx. 1.7 kb, approx. 1.8 kb and approx. 2.8 kb, in wild-type flowers (Fig. 1). These transcripts were poorly detected in flowers of *coil* (Fig. 1).

In order to isolate full-length cDNAs corresponding to the 1.7-, 1.8- and 2.8-kb transcripts, a fragment from clone 1.2 was used to re-screen the library. Twenty-one independent clones were isolated and divided into restriction groups. Clones representative of each group were sequenced, and two related cDNAs homologous to MBPs were identified. One cDNA (*MBP1*) was identical to the previous clone 1.1, whereas a larger one (*MBP2*) represented a full-length cDNA of clone 1.2.

To certify that *MBP2* corresponded to the larger transcript of approx. 2.8 kb observed on Northern blots, a fragment specific to *MBP2* cDNA was used to probe RNA from flowers. Figure 1 shows that the probe derived from *MBP2* preferentially detected the approx. 2.8-kb transcript in wild-type flowers. Although a transcript of approx. 1.7 kb was frequently observed on Northern blots (Fig. 1), a cDNA smaller than *MBP1* was not isolated in our screenings.

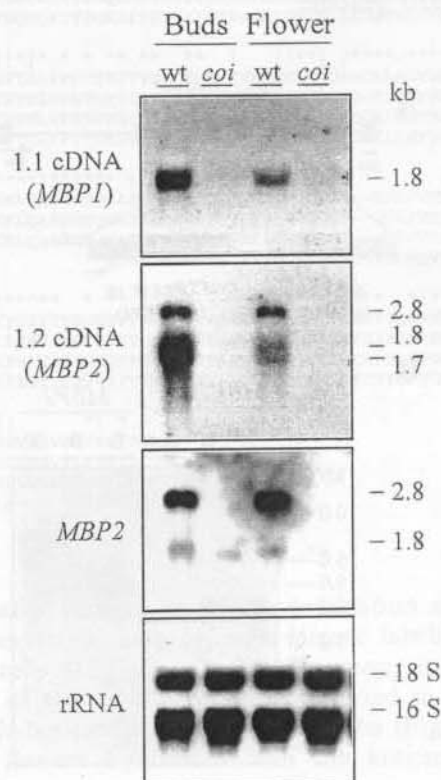


Fig. 1 Expression of *MBP1* and *MBP2* genes in buds and developed flowers of wild-type (wt) *Arabidopsis thaliana* and the *coil* mutant. RNA was probed with cDNA clones 1.1 and 1.2 (*MBP1* and *MBP2*, respectively), and with a fragment specific to *MBP2* cDNA. Transcripts of 1.7, 1.8 and 2.8 kb were detected in the wild type, but not in the male-sterile flowers of *coil*. Similar amounts of RNA were loaded in each lane as revealed by the hybridization to a 16 S rRNA.

Genomic structure and sequence analysis of *Arabidopsis* MBP genes

Sequences from *Arabidopsis* chromosome 1 (AC006216) showed the existence of a cluster of seven related genes homologous to previously described MBPs from *Brassica napus* (Fig. 2A). Sequence alignments between *MBP1* and *MBP2* with BAC F5F19 clearly shows that *MBP1* corresponds to the Col-0 *F5F19.10* MBP gene. *MBP2* is highly similar to the Col-0 *F5F19.9* MBP gene (96% identity); however, *MBP2* has additional coding sequences relative to *F5F19.9* MBP and therefore may represent a different Landsberg allele.

To investigate the copy number and relatedness of the *Arabidopsis* MBP genes, two probes derived from the 5' ends of *MBP1* and *MBP2* were used in Southern blot experiments (Fig. 2B). The two probes detected mainly single strongly hybridizing bands in genomic DNA digested with three different enzymes, under high-stringency conditions (Fig. 2B). Two hybridizing bands were observed in *Xba*I-digested DNA probed with *MBP2*, although no *Xba*I sites are found in either *MBP2* cDNA or genomic *F5F19.9* sequences. We concluded from these experiments that *MBP1* and *MBP2* are represented as single-copy genes in the *Arabidopsis* genome.

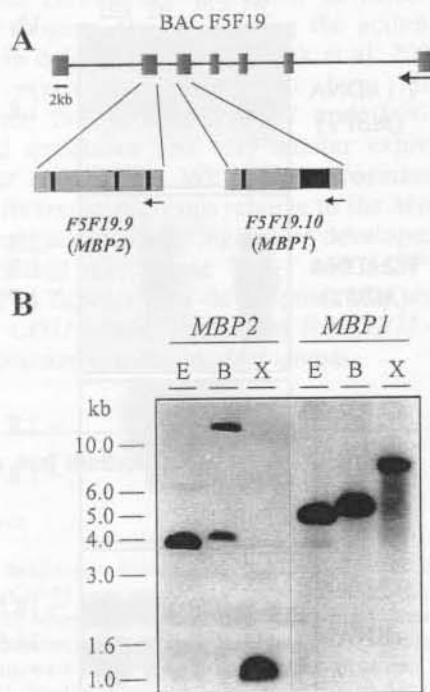


Fig. 2A, B Genomic organization of *Arabidopsis* MBP genes. **A** Schematic representation of the *Arabidopsis* chromosome 1 region (BAC F5F19) comprising seven putative MBP genes (boxes). The genes encoding *MBP1* (*F5F19.10*) and possibly *MBP2* (*F5F19.9*) are shown in detail, with introns (black) and exons (gray). Arrows indicate the orientation of transcription. **B** Southern blot analysis of *Arabidopsis* genomic DNA digested with *Eco*RI (E), *Xba*I (B) and *Xho*I (X), hybridized to *MBP1* (286-bp *Eco*RI fragment) or *MBP2* probe (571-bp *Eco*RI/*Ssp*I fragment)

The *MBP1* and *MBP2* cDNAs possibly encode for proteins of 462 (*MBP1*) and 664 amino acids (*MBP2*), which are homologous to MBPs from *Brassica napus* and *Arabidopsis* (Fig. 3). The deduced proteins are composed of three (*MBP1*) or four (*MBP2*) repeated domains, a characteristic that is also found in *B. napus* MBPs (Taipalensuu et al. 1997a, c; Geshi and Brandt 1998). In addition, the deduced *MBP1* and *MBP2* proteins show significant homology to plant agglutination factors and lectins such as jacalin, particularly in their C-terminal regions (Fig. 3).

A special feature of the *MBP2* deduced protein is the presence of a 54-amino-acid sequence rich in proline (50%) and alanine (36%) found between the second and third domains (Fig. 3). The proline (P) residues are confined to stretches of PX, where X is frequently alanine (A). The PA-rich region is also found in an MBP from *B. napus* seeds (Taipalensuu et al. 1997a) and in an f-AtMBP recently isolated from *Arabidopsis* flowers (Takechi et al. 1999).

MBP2 is 96% identical to f-AtMBP, and the main difference between the two sequences is the number of PX repeats (Fig. 3). We observed that the deduced polypeptide from f-AtMBP (Takechi et al. 1999) almost perfectly matches the protein derived from the genomic sequence *F5F19.9* MBP, except that it includes four additional amino acid residues in its N-terminal (Fig. 3).

Flower-specific expression of *Arabidopsis* MBP genes

The expression of both *MBP1* and *MBP2* is restricted to floral tissues and requires the *COI1* function (Fig. 4A). Because MBPs have been suggested to be associated with myrosinase enzymes (Bones and Rossiter 1996), we looked at the overall expression of an *Arabidopsis* myrosinase gene *TGG1* (Chadchawan et al. 1993) for comparison. We observed that *TGG1* has a pattern of expression different from that of the MBP genes. *TGG1* mRNA was found in green tissues, including leaves and siliques, but, similar to MBP transcripts, it is abundant in flowers and absent in roots. Interestingly, *TGG1* expression is only partially affected by the *coil* mutation (Fig. 4A). Since *TGG1* mRNA was found in flowers and its expression was significantly diminished in *coil*, we followed its transcript accumulation relative to *MBP1* during stages of flower development. Figure 4B shows that the expression of *TGG1* parallels that of *MBP1* during flower development, and that both transcripts are high in immature flowers, but progressively decrease as flowers begin to open, mature and senesce. Male-sterile flowers of *coil* do not express *MBP1* in the floral stages examined, but show a low expression of *TGG1* (Fig. 4B).

Since the MBP genes and *TGG1* are dependent on *COI1* for flower expression, we tested whether they could be induced by jasmonate in vegetative tissues. Figure 5 shows that *MBP1* and *TGG1* are weakly induced by MeJA in wild-type seedlings after 4 h of jasmonate treatment.

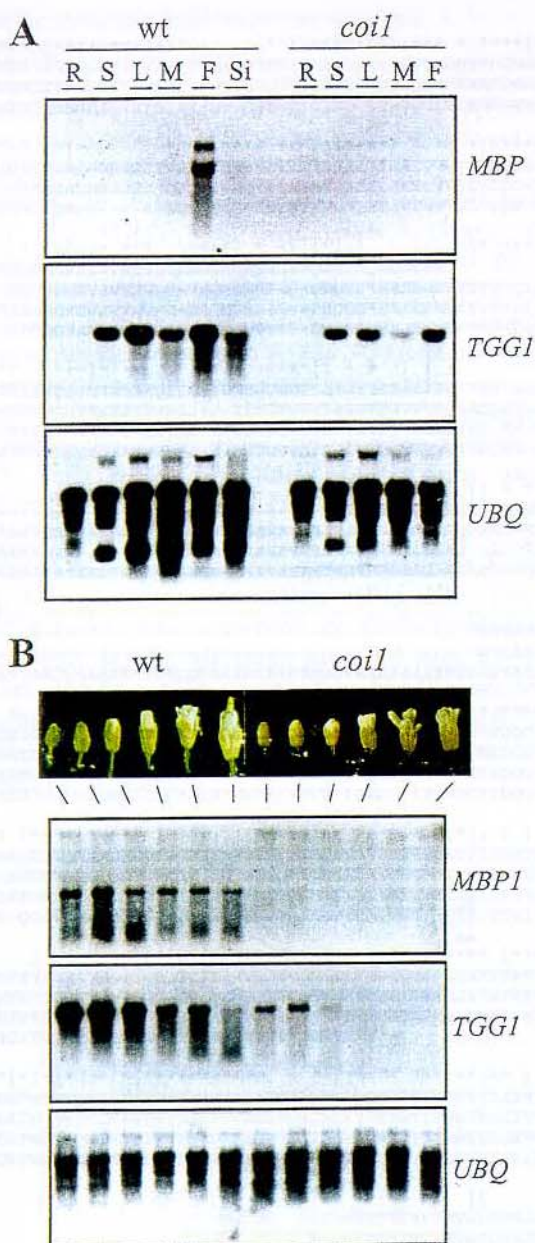


Fig. 4A, B Flower specific expression of the *Arabidopsis* *MBP* genes, and their dependency on *COII*. **A** *MBP1* and *MBP2* transcripts are expressed exclusively in flowers (F) of wild-type plants. Transcripts of a myrosinase gene (*TGG1*) are nevertheless present in seedlings (S), young (L) and mature (M) leaves, flowers (F) and siliques (Si), but not in roots (R) of both wild-type and *coil* plants. However, the *coil* mutation also affected *TGG1* expression. **B** The accumulation and disappearance of *MBP1* and *TGG1* transcripts occurs in parallel during the stages of flower development, but expression of *TGG1* is only partially affected by *COII*. Total RNA hybridized to a ubiquitin gene is shown (*UBQ*)

Myrosinase activity is increased in flowers and is affected by *COII*

MBPs are thought to play a role in the myrosinase-glucosinolate system, and because both *MBP* and *TGG1* transcript levels are relatively lower in *coil* tissues, we

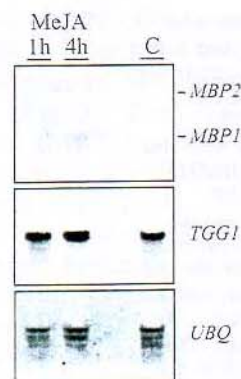


Fig. 5 Transcript accumulation of *MBP1*, *MBP2* and *TGG1* in wild-type *Arabidopsis* seedlings in response to MeJA. Northern analysis of seedlings treated with MeJA (10 μ M) for 1 and 4 h reveals a very weak *MBP1* and *TGG1* response to jasmonate, compared to untreated controls (C). *MBP2* transcripts could not be detected. The ubiquitin (*UBQ*) control for RNA loading is shown

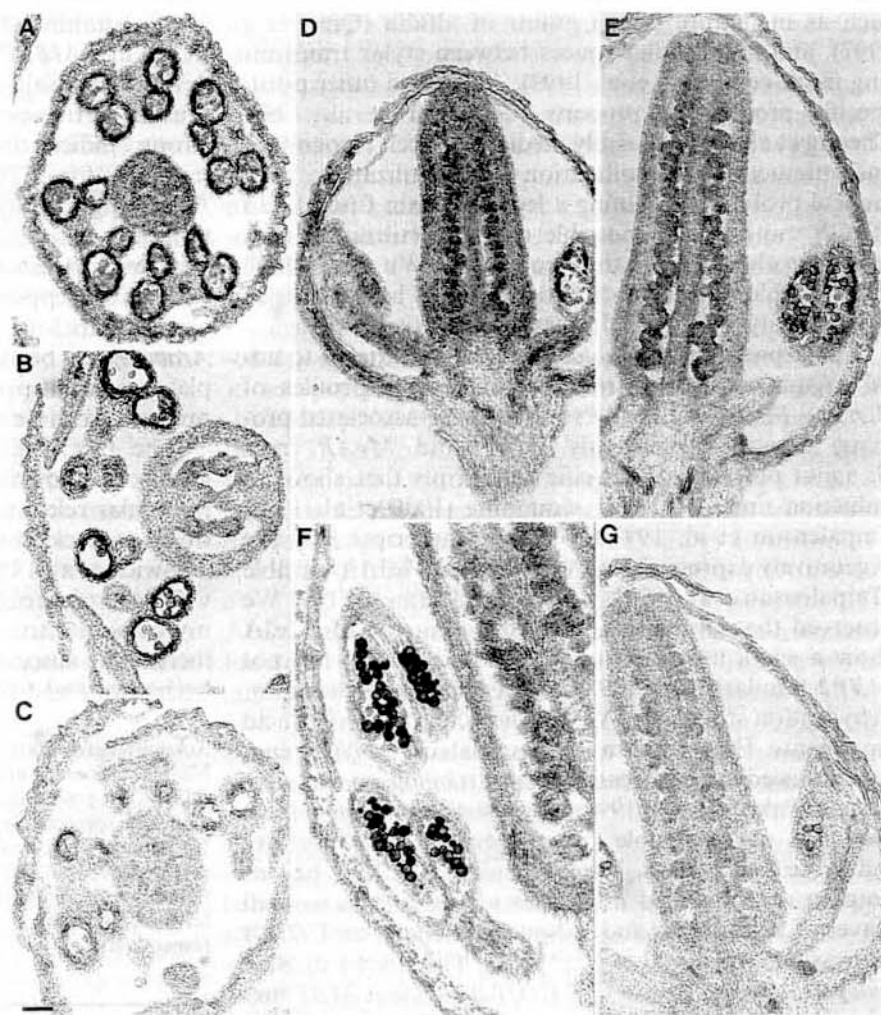
measured myrosinase activity from leaf and flower extracts using sinigrin as substrate (Fig. 7). We observed that the myrosinase activity toward sinigrin is higher in flowers than in leaves of *Arabidopsis* and that this activity is significantly reduced in these organs in the *coil* mutant. On average, the myrosinase activity was 60% and 90% lower in *coil* flowers and leaves, respectively (Fig. 7).

Discussion

This work presents the isolation and characterization of two flower-specific *MBP* genes, which are absent in male-sterile flowers of the *Arabidopsis* *coil* mutant. Transcripts related to *MBP* genes have been identified in *Arabidopsis* flowers (Utsugi et al. 1996), and a gene (*f-AtMBP*) encoding a flower-specific MBP similar to *MBP2* has been described (Takechi et al. 1999). Indeed, the sequencing of the *Arabidopsis* genome has revealed the existence of a gene cluster in chromosome 1 harboring seven open-reading frames homologous to MBPs (AC006216). The cDNAs corresponding to the two major transcripts observed in developing flowers are represented in this gene cluster. *MBP1* is identical to the Col-0 *F5F19.10* gene, except for a single amino acid change. However, the sequence of *MBP2* differs slightly from its putative corresponding Col-0 allele in chromosome 1, particularly in the PX repeated region, which is longer in *MBP2* relative to *F5F19.9* MBP (same as *f-AtMBP*). A few amino acid changes between *MBP2* and *F5F19.9* MBP may reflect an ecotype variation.

The function of these *MBP* genes in flowers of *Arabidopsis* is currently unknown. In *B. napus*, MBPs have been suggested to participate in the myrosinase-glucosinolate system that is implicated in defense against herbivores and pathogens (reviewed by Bones and Rossiter 1996; Rask et al. 2000). MBPs are able to form complexes with myrosinases, as evidenced by

Fig. 6A–G In situ localization of *MBP1* in flowers of wild-type *Arabidopsis*. **A–C** Transverse sections of the wild type (**A**) and the *coil* mutant (**B**) hybridized with the antisense probe are compared with the wild type probed with sense *MBP1* (**C**). **D–G** Longitudinal sections of immature (**D**) and developed (**E, F**) wild-type flowers hybridized with antisense *MBP1* or sense control (**G**). Hybridization signal (blue) is found in male and female organs more intensely in developing flowers (**A, D**) relative to wild-type controls (**C, G**) and *coil* (**B**). Stronger signals are observed in the ovary, ovules, filament and tapetal cells. Bar = 30 μ m



immunoaffinity experiments (Falk et al. 1995; Geshi and Brandt 1998; Geshi et al. 1998). In addition, purified MBPs from *B. napus* seeds were shown to possess lectin activity, suggesting that they could specifically bind to glycosylated myrosinases (Taipalensuu et al. 1997c). In this respect, the C-termini of the *Arabidopsis* MBPs are very similar to those of a maize aggregating factor (Esen and Blanchard 2000) and lectins such as jacalin from *Artocarpus integrifolia* and agglutinin from *Maclura pomifera* (Young et al. 1991). Jacalins constitute a distinct group of lectins, known to bind human IgA₁ specifically through the galactose-terminal oligosaccharides (Skea et al. 1988). Although the amino acid residues of jacalin important for the methyl-galactose binding are not fully conserved in the *Arabidopsis* and *B. napus* MBPs, *B. napus* MBP also binds IgA in vitro through its jacalin homologous region (Geshi and Brandt 1998).

Interestingly, the MBP2 predicted protein presents a repetitive proline-rich region (PX). Proline-rich motifs (Hyp-X)_n are widespread in arabinogalactan proteins (AGPs) belonging to the family of hydroxyproline (Hyp)-rich glycoproteins (HGRPs). In these proteins, Pro residues are usually post-translationally hydroxylated to form Hyp, and X is usually alanine, threonine or

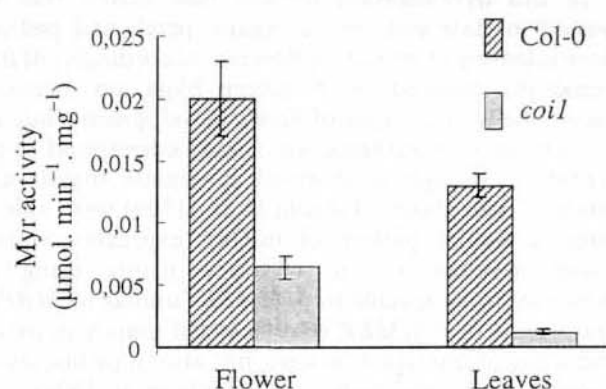


Fig. 7 Specific myrosinase activity in flowers and leaves of *Arabidopsis*. Protein extracts (20–50 μ g) from the wild type (*Col-0*) and the *coil* mutant were assayed for myrosinase activity toward sinigrin in sodium phosphate buffer pH 6.0, at 27 °C, as described in *Materials and methods*. Decay in absorbance due to sinigrin breakdown was measured at 227 nm. Values are means $\pm$ SD of four measurements

serine. Non-contiguous Hyp residues are sites of arabinogalactan polysaccharide attachment (Shpak et al. 1999). AGPs are found in a variety of organs and tissues,

such as in mature pollen grains of alfalfa (Qiu et al. 1997), and intercellular spaces between stylar transmitting tissue cells (Gao et al. 1999). AGPs and other pistil-specific proline-rich proteins (Goldman et al. 1992; Cheung et al. 1993) possibly mediate cell-cell recognition and interactions in pollination and fertilization. Chimerical proteins containing a lectin domain fused to an HRGP motif with a possible role in fertilization processes are also found in tobacco flowers (Wu et al. 1993). It is possible, therefore, that these MBPs have a role in male fertility since *coil* flowers do not express them.

The expression of *Arabidopsis* MBPs restricted to floral organs is distinct from the expression profiles of *B. napus* MBPs and MyAPs (myrosinase-associated proteins) described previously. *MBP* and *MyAP* from *B. napus* possess seed-specific transcripts that show no induction upon MeJA or wounding (Falk et al. 1995; Taipalensuu et al. 1997a, b), and transcripts that are vegetatively expressed, and wound- and MeJA-inducible (Taipalensuu et al. 1997b, c; Geshi and Brandt 1998). We observed that *Arabidopsis* seedlings treated with MeJA show a small induction of *MBP1* and *TGG1*, but not *MBP2*. Similarly, *f-AtMBP* did not respond to wounding, dehydration stress, MeJA, salicylic acid, or abscisic acid treatments. However, transcripts related to *MBP* genes were induced by such treatments in *Arabidopsis* vegetative tissues (Takechi et al. 1999), suggesting that *Arabidopsis* also has non-inducible organ-specific and vegetative inducible *MBP* genes. More recently, an EST homologous to a JA-induced *MBP* was identified in wounded leaves of *Arabidopsis* and shown to depend on *COI1* for expression (Reymond et al. 2000). This shows that *Arabidopsis* has two classes of *COI1*-dependent *MBP* genes which are differentially regulated in different tissues.

In situ hybridization showed that *MBP1* was expressed in male and female organs, petals and pedicels more intensely in immature flowers. Accordingly, *MBP1* transcripts detected on Northern blots are increased during the initial stages of flower development, but are maintained after anthesis, which may correspond to the hybridization signals observed in female organs and petals at later stages. Takechi et al. (1999) were able to detect a similar pattern of mRNA expression during flower development in wild-type plants using an antisense probe specific to *f-AtMBP* (similar to *MBP2*). Transcripts of *f-AtMBP* were detected mainly in ovules and styles of immature flowers, but also in pistils, styles, stamens, petals and embryos (Takechi et al. 1999).

Transcripts of myrosinases *TGG1* and *TGG2* have been found in sepals, petals and female organs of *Arabidopsis* flowers, but not in pollen grains or stamens (Xue et al. 1995). Thus, the presence of *MBP1* and *f-AtMBP* (Takechi et al. 1999) transcripts in stamens of *Arabidopsis* flowers could indicate an alternative function of MBPs not related to the myrosinase-glucosinolate system. Except in *B. napus*, where both myrosinase and MBPs were co-localized to myrosin grains found in myrosin cells of cotyledons (Geshi et al. 1998), a similar correlation between MBPs and myrosinases has not

been established in other plants. Here we show that *TGG1* and *MBP1* mRNAs are expressed in flowers in a developmentally similar way. However, *TGG1* mRNA is present in tissues where *MBP* transcripts are absent, a strong indication that *MBP1* and *MBP2* are not required for *TGG1* function, particularly in leaves. Accordingly, myrosinase activities toward sinigrin determined in *coil* are lower in leaves than in flowers, relative to the wild type. These observations do not exclude the possibility of MBPs being functional as components of a myrosinase-glucosinolate system in *Arabidopsis*, but alternatively, suggest that they could play a role, in principle as lectins, during flower development, or in defense against insects (Rask et al. 2000).

The fact that *coil* plants have significantly lower levels of myrosinase activities in leaves and flowers is of particular relevance since these plants are more susceptible to attack by insects and fungi (McConn et al. 1997; Staswick et al. 1998; Vijayan et al. 1998). Further studies will be required to determine whether the reduced myrosinase activity in *coil* plants is directly linked to the increased susceptibility of this mutant to insect herbivory and fungal infection.

Acknowledgements We thank Dr. John G. Turner, Dr. Elliot M. Meyerowitz and the Arabidopsis Biological Resource Center (USA) for providing us the *coil* seeds, cDNA library, and EST clones, respectively. We acknowledge Márcio J. Silva and Sílvia R. Turcinelli for technical assistance. This work was supported by grants (95/6662-5) from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). A.N.C. and C.E.B. received long-term fellowships from FAPESP (96/12065-2 and 97/0917-7, respectively).

References

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1989) Current protocols in molecular biology. Wiley, New York
- Benedetti CE, Xie D, Turner JG (1995) COI-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol* 109:567-572
- Benedetti CE, Costa CL, Turcinelli SR, Arruda P (1998) Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *coil* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 116:1037-1042
- Bernardi R, Negri A, Ronchi S, Palmieri S (2000) Isolation of the epithiospecifier protein from oil-rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed and its characterization. *FEBS Lett* 467:296-298
- Bones AM, Rossiter JT (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol Plant* 97:194-208
- Chadchawan S, Bishop J, Thangstad OP, Bones AM, Mitchell-Olds T, Bradley D (1993) *Arabidopsis* cDNA sequence encoding myrosinase. *Plant Physiol* 103:671-672
- Chen S, Halkier BA (1999) Functional expression and characterization of the myrosinase MYR1 from *Brassica napus* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 17:414-420
- Cheung AY, May B, Kawata EE, Gu Q, Wu H-M (1993) Characterization of cDNAs for stylar transmitting tissue-specific proline-rich proteins in tobacco. *Plant J* 3:151-160
- Costa CL, Arruda P, Benedetti CE (2000) An *Arabidopsis* gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases. *Plant Mol Biol* 44:67-71

- Esen A, Blanchard DJ (2000) A specific beta-glucosidase-aggregating factor is responsible for the beta-glucosidase null phenotype in maize. *Plant Physiol* 122:563–572
- Falk A, Taipalensuu J, Ek B, Lenman M, Rask L (1995) Characterization of rapeseed myrosinase-binding protein. *Planta* 195:387–395
- Feys BJB, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6:751–759
- Gao MG, Kieliszewski MJ, Lamport DTA, Showalter AM (1999) Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the *LeAGP-1* gene. *Plant J* 18:43–55
- Geshi N, Brandt A (1998) Two jasmonate-inducible myrosinase-binding proteins from *Brassica napus* L. seedlings with homology to jacalin. *Planta* 204:295–304
- Geshi N, Andreasson E, Meijer J, Rask L, Brandt A (1998) Colocalization of myrosinase- and myrosinase-binding proteins in grains of myrosin cells in cotyledon of *Brassica napus* seedlings. *Plant Physiol Biochem* 36:583–590
- Goldman MH de S, Pezzotti M, Seurinck J, Mariani C (1992) Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *Plant Cell* 4:1041–1051
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257:967–971
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE and Browse J (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5473–5477
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Qiu X, Wu Y, Du S, Erickson L (1997) A new arabinogalactan protein-like gene expressed in the pollen of alfalfa. *Plant Sci* 124:41–47
- Rask L, Andréasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* 42:93–113
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:707–719
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schwimmer S (1961) Spectral changes during the action of myrosinase on sinigrin. *Acta Chem Scand* 15:535–544
- Shpak E, Leykam JF, Kieliszewski MJ (1999) Synthetic genes for glycoprotein design and the elucidation of hydroxyproline-O-glycosylation codes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14736–14741
- Skea DL, Christopoulos P, Plaut AG, Underdown BJ (1988) Studies on the specificity of the IgA-binding lectin, jacalin. *Mol Immunol* 25:1–6
- Staswick PE, Yuen GY, Lehman CC (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* 15:747–754
- Taipalensuu J, Falk A, Ek B, Rask L (1997a) Myrosinase-binding proteins are derived from a large wound-inducible and repetitive transcript. *Eur J Biochem* 243:605–611
- Taipalensuu J, Andreasson E, Eriksson S, Rask L (1997b) Regulation of the wound-induced myrosinase-associated protein transcript in *Brassica napus* plants. *Eur J Biochem* 247:963–971
- Taipalensuu J, Eriksson S, Rask L (1997c) The myrosinase-binding protein from *Brassica napus* seeds possesses lectin activity and has a highly similar vegetatively expressed wound-inducible counterpart. *Eur J Biochem* 250:680–688
- Takechi K, Sakamoto W, Utsugi S, Murata M, Motoyoshi F (1999) Characterization of a flower-specific gene encoding a putative myrosinase binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 40:1287–1296
- Utsugi S, Sakamoto W, Ogura Y, Murata M, Motoyoshi F (1996) Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to the genes expressed preferentially in floral organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 32:759–765
- Verwoerd TC, Dekker BMM, Hoekema A (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res* 17:2362
- Vijayan P, Shockey J, Lévesque CA, Cook RJ, Browse J (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7209–7214
- Wu H-M, Zou J, May B, Gu Q, Cheung AY (1993) A tobacco gene family for flower cell wall proteins with a proline-rich domain and a cysteine-rich domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6829–6833
- Xue J, Jørgensen M, Pihlgren U, Rask L (1995) The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization, expression and evolution. *Plant Mol Biol* 27:911–922
- Young NM, Johnston RAZ, Watson DC (1991) The amino acid sequences of jacalin and the *Maclura pomifera* agglutinin. *FEBS Lett* 282:382–384

Resultados

Com o intuito de investigar a função da proteína MBP1 em *Arabidopsis*, resolvemos transformar plantas com os cDNAs da MBP1 nas orientações sense e antisense, em uma tentativa de obter plantas superexpressando ou silenciando o gene endógeno.

Os clones pBI MBP 1 sense e antisense obtidos foram utilizados para transformar células de agrobactéria. A figura 9 mostra um "Southern blot" de DNA plasmidial extraído de agrobactérias, confirmando a transformação das mesmas.

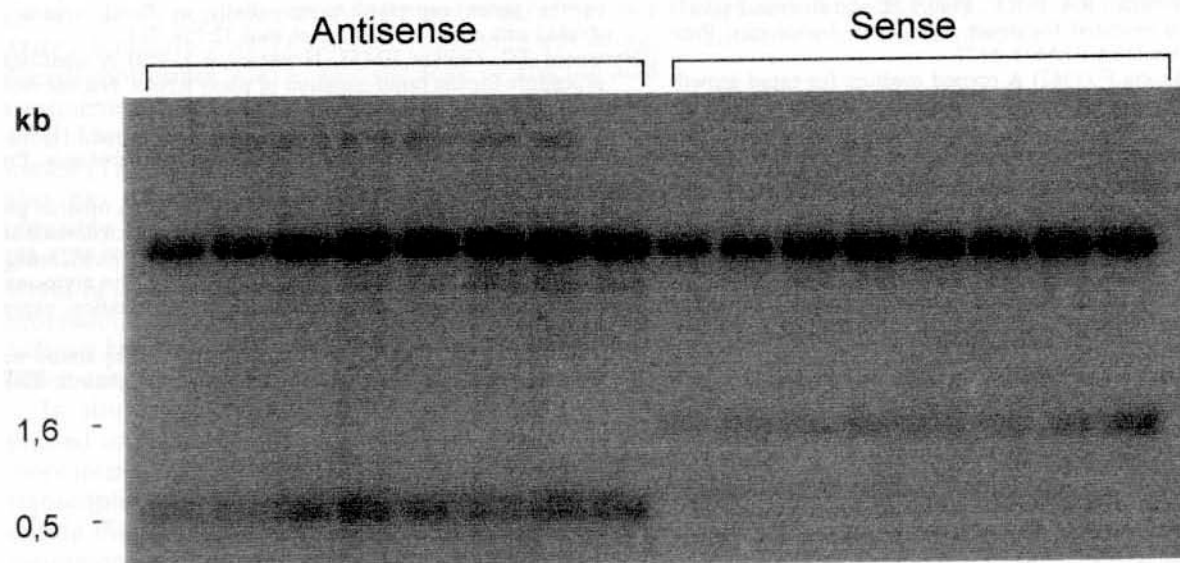


Figura 9- "Southern blot" de DNA plasmidial de agrobactéria digerido com *EcoR* I, confirmando a presença dos insertos no plasmídeo pBI nas orientações antisense (banda de 0,6 kb) e sense (banda de 1,6 kb). A membrana foi hibridizada com o fragmento *Spe* I de 800 pb do clone *MBP1*.

Apenas as plântulas transformadas com agrobactéria contendo a construção sense do gene MBP1 originaram sementes. A partir de aproximadamente 12.000 sementes germinadas, duas plântulas F1 resistentes à canamicina foram isoladas. As plântulas cresceram até a fase de florescimento, e

suas sementes foram recolhidas. No entanto, ainda não realizamos os testes de análise de segregação da resistência à canamicina, análise de “Southern blot” ou reações de PCR para confirmação da incorporação do transgene nas plantas F2.

Grãos de pólen das duas plantas F1 resistentes à canamicina foram utilizados para fertilizar flores de plantas *coi1*. As sementes resultantes da polinização cruzada foram recolhidas, e as plantas F2, heterozigotas para o gene *COI1*, foram crescidas até o florescimento. Uma vez confirmada a incorporação dos transgenes nas plantas, as sementes heterozigotas *coi1* deverão ser germinadas em meio MS com MeJA para seleção da geração F3, homozigota para o gene *COI1*, e então transferidas para meio com canamicina para seleção das plantas resistentes ao antibiótico.

RNA de plantas F3-*coi1* e F2-selvagens transgênicas será extraído para a utilização em membranas de “Northern blot”, para avaliação da expressão do gene *MBP1* endógeno e observação do fenótipo apresentado.

Discussão

As proteínas ligantes de mirosinase (“myrosinase binding proteins” ou MBPs) foram inicialmente isoladas de *Brassica napus* por co-precipitação com anticorpos monoclonais produzidos contra mirosinases de sementes dessa espécie (Lenman *et al.*, 1990). Esse resultado sugeriu que as MBPs eram capazes de se ligar às mirosinases, fazendo parte do complexo mirosinase-glicosinolato encontrado nas espécies pertencentes à ordem Capparales (Chew, 1988).

Os glicosinolatos e seus produtos de hidrólise parecem desempenhar importante papel na interação entre plantas e patógenos ou herbívoros, servindo tanto como atrativos para a alimentação e a oviposição de herbívoros especialistas em crucíferas (Stotz *et al.*, 2000), quanto no sistema de defesa de plantas contra insetos e microorganismos (Bones e Rossiter, 1996). Os glicosinolatos podem, também, servir como um estoque de glicose, nitrogênio e enxofre mobilizado em função das necessidades de crescimento em diferentes estágios do desenvolvimento da planta (crescimento vegetativo, germinação e florescimento) (Bones e Rossiter, 1996).

As mirosinases são tioglicosidases que clivam os glicosinolatos e originam D-glicose, íon sulfato, e compostos intermediários, os quais sofrem rearranjo espontâneo e formam isotiocianatos, tiocianatos, nitrilas ou epitionitrilas, dependendo de vários fatores, como pH, presença de Fe^{2+} e outras proteínas (James e Rossiter, 1991). As mirosinases são proteínas diméricas glicosiladas, com subunidades de massa molecular entre 62 a 77 kDa, apresentando diferentes graus de glicosilação, de ativação por ácido ascórbico, e de taxas de hidrólise sobre diferentes glicosinolatos (Thangstad *et al.*, 1993).

As mirosinases são codificadas por famílias gênicas. Em *Sinapis alba*, duas subfamílias foram identificadas (Xue *et al.*, 1992), enquanto em *B. napus*, três subfamílias foram descritas (Falk *et al.*, 1995a). Em *Arabidopsis thaliana* apenas três genes de mirosinase parecem estar presentes, e podem ser agrupados em duas subfamílias (Xue *et al.*, 1995 e 1992).

Nosso trabalho mostrou que o gene *TGG1*, que codifica uma das mirosinases de *Arabidopsis*, é expresso em vários órgãos da planta, com exceção

de raízes (Fig. 4, artigo). Utilizando a técnica de hibridização *in situ*, Xue e colaboradores (1995) mostraram, em *Arabidopsis*, a expressão de *TGG1* em folhas, sépalas, pétalas e gineceu de botões florais, e em sementes de 15 dias após fertilização. A expressão de mirosinases em vários órgãos também foi demonstrada em *B. napus* e *S. alba*. Em *B. napus*, o gene *MB* foi detectado em todos os tecidos com exceção de raízes, e em maior quantidade em sementes maduras, cotilédones e folhas jovens, enquanto os genes *MA* e *MC* são expressos unicamente em sementes (Falk *et al.*, 1995a; Lenman *et al.*, 1993). Em *S. alba*, os genes *MA* são expressos preferencialmente no eixo do embrião, enquanto os genes *MB* são ativos em cotilédones e embriões, assim como na maioria das partes da plântula jovem e em níveis maiores na maioria dos tecidos da planta madura (Xue *et al.*, 1993). Em plantas de *B. napus*, MeJA aplicado exogenamente promove indução do transcrito correspondente ao gene *MB* de mirosinase (Taipalensuu *et al.*, 1997a). Em *Arabidopsis*, MeJA também causa um pequeno aumento no nível de transcritos do gene *TGG1* de mirosinase em folhas (Fig. 5, artigo).

Em *B. napus*, 3 diferentes classes de mirosinases estão presentes em sementes, uma forma livre de 75 kDa e duas formas de 70 e 65 kDa que formam grandes complexos com duas MBPs de 50 e 52 kDa (Falk *et al.*, 1995b). As MBPs não têm atividade de mirosinase, não são glicosiladas e podem aparecer tanto na forma livre como em complexos, ligadas às mirosinases (Falk *et al.*, 1995b). As MBPs parecem formar uma família de proteínas modulares, nas quais o número e os tipos de domínio repetitivos variam (Geshi e Brandt, 1998; Taipalensuu *et al.*, 1997b e 1997c). Essa repetição de domínios também pode ser verificada nas MBPs1 e 2 isoladas neste trabalho (Fig. 3, artigo). Taipalensuu e colaboradores (1997c) foram capazes de detectar MBPs de tamanhos variados e com dois tipos principais de expressão. Transcritos de 1,0; 1,7 e 2,4 kb foram detectados apenas em sementes, e não são afetados por tratamento com MeJA ou machucado, e transcritos de 1,65 e 3,3 kb são encontrados em todos os órgãos da planta com exceção de folhas maduras e raízes, com forte indução por MeJA e machucado em folhas. A caracterização da expressão da *MBP1* através de hibridização *in situ*

e “Northern blots” revelou que a isoforma encontrada em *Arabidopsis* está presente apenas em flores (Fig. 4, artigo), tanto no androceu como no gineceu, e em pétalas (Fig. 6, artigo), e sofre pequena indução por MeJA na folha (Fig. 5, artigo). A expressão de *MBP2* também é restrita aos órgãos florais da planta (Fig. 4, artigo), e não sofre indução por MEJA (Fig. 5, artigo). Esses resultados sugerem que as MBPs1 e 2 de *Arabidopsis* são correspondentes às MBPs com expressão tecido-específica de *B. napus*.

Através de análise de “Southern blot”, verificamos que as MBPs1 e 2 são codificadas por um ou poucos genes (Fig. 2, artigo). Isso também ocorre em *B. napus*, como é o caso das MBPs de 70 kDa e 97 kDa isoladas de plântulas crescidas no escuro (Geshi e Brandt, 1998), e do cDNA fMBP3 isolado de sementes imaturas (Taipalensuu *et al.*, 1997c). Utilizando como sonda heteróloga a sequência de um dos domínios repetitivos do clone fMBP3, Taipalensuu e colaboradores (1997c) identificaram uma única banda em *Arabidopsis*. Uma vez que esses autores utilizaram como sonda o domínio repetitivo característico das MBPs de Brassicaceae e lavaram a membrana de “Southern blot” com baixa estringência, o resultado obtido é contraditório com o conhecimento da existência de 17 genes homólogos às MBPs no genoma de *Arabidopsis* (Rask *et al.*, 2000). A repetição do “Southern blot” com a utilização de uma sonda homóloga e lavagens de baixa estringência pode esclarecer a diversidade da família das MBPs em *Arabidopsis*.

As MBPs de *B. napus* possuem atividade de lectina e homologia com lectinas de *Artocarpus integer* e *Maclura promifera* (Geshi e Brandt, 1998; Taipalensuu *et al.*, 1997b). As MBPs são capazes de formar complexo com as mirosinases, como demonstrado em experimentos de imunoafinidade (Geshi e Brandt, 1998), e de reter as atividades de mirosinase de 70 kDa quando ligadas a resinas de *p*-aminofenil- α -D-manopiranosídeo, e *N*-acetilglicosamina (Taipalensuu *et al.*, 1997b). A MBP de 70 kDa foi imunolocalizada em corpos protéicos com estrutura muito semelhante aos grânulos de mirosina (Geshi e Brandt, 1998), onde se localizam as mirosinases em diferentes espécies de Brassicaceae (Xue *et al.*, 1993; Thangstad *et al.*, 1991). As mirosinases e as

MAPs (“myrosinase associated proteins”) possuem carboidratos ligados a resíduos de asparagina, sendo que esses carboidratos são caracterizados por um núcleo pentassacarídeo comum, consistindo de manose e N-acetilglicosamina. As MBPs poderiam, portanto, interagir com as mirosinases e outras proteínas presentes no complexo através de sua atividade de lectina pela ligação aos resíduos de manose ou de N-acetilglicosamina presente nos carboidratos das proteínas glicosiladas (Taipalensuu *et al.*, 1997b). As MBPs1 e 2 também apresentam similaridade com a cadeia α da proteína jacalina de *Artocarpus integrifolia*, podendo exercer o mesmo papel sugerido para as MBPs de outras Brassicaceae.

Os glicosinolatos foram encontrados, juntamente com ácido ascórbico, em vacúolos de células não especializadas (Bones e Rossiter, 1996). Recentemente, um anticorpo contra sinigrina imunolocalizou esse glicosinolato em grânulos protéicos de células da aleurona em sementes e plântulas de *Brassica juncea*, aonde também foi detectada a presença de mirosinase (Kelly *et al.*, 1998). Esses resultados sugerem que a mirosinase está presente no mesmo compartimento subcelular que seu substrato, o glicosinolato, e um cofator necessário para sua atividade, o ácido ascórbico. O ácido ascórbico presente no vacúolo em concentrações altas inibiria a atividade da mirosinase. Após rompimento do vacúolo, a concentração de ácido ascórbico diminuiria graças à diluição com o conteúdo citoplasmático, a ponto de ativar a mirosinase, que teria acesso imediato a seu substrato (Bones e Rossiter, 1996). Esse tipo de cinética de ativação e inibição de mirosinase por ácido ascórbico foi verificado em *Raphanus sativus* (Shikita *et al.*, 1999).

Geshi e Brandt (1998) propõe uma possível função para as MBPs no sistema glicosinolato- mirosinase durante reações de defesa. As mirosinases estão co-localizadas com os glicosinolatos nas células de mirosina, porém em uma forma enzimaticamente inativa. Após injúria da planta, os níveis de jasmonato aumentam, e ocorre a indução das MBPs de 70 kDa e 97 kDa, enquanto o transcrito correspondente à mirosinase se mantém inalterado. A atividade de lectina das MBPs seria responsável por mediar as interações entre mirosinases e outras glicoproteínas presentes no complexo, de forma a aproximar atividades

capazes de auxiliar e modificar a hidrólise dos glicosinolatos (Taipalensuu *et al.*, 1997b).

Em *Arabidopsis*, 23 tipos diferentes de glicosinolatos foram descritos (Haughn *et al.*, 1991), sendo que apenas 2 transcritos ativos de mirosinase foram identificados (Xue *et al.*, 1995). A especificidade das mirosinases contra a ampla variação de substratos reconhecidos pode ser afetada por fatores associados às enzimas, como por exemplo, as MBPs, MAPs ou outros componentes (Bones e Rossiter, 1996). A existência de uma família gênica de MBPs em *Arabidopsis* deve refletir as diferenças de expressão do complexo mirosinase-glicosinolato em função do tecido e dos estágios de desenvolvimento da planta, bem como da especificidade da enzima sobre os diversos substratos encontrados. É possível que um sistema de regulação tenha evoluído através da duplicação gênica e da divergência para produzir um grupo de genes, cada um com um padrão de expressão temporal e espacial, ao invés da evolução de uma única região regulatória complexa em um único gene (Milligan e Gasser, 1995).

Além da co-localização de mirosinases e MBPs no mesmo compartimento subcelular (Geshi *et al.*, 1998), e da capacidade de MBPs de se ligarem a mirosinases (Geshi e Brandt, 1998, Taipalensuu *et al.*, 1997b), nenhuma outra correlação entre essas proteínas foi demonstrada até o momento. Nosso trabalho mostrou a expressão paralela de *MBP1* e *TGG1* durante o desenvolvimento floral de *Arabidopsis* (Fig. 4, artigo), e a maior atividade de mirosinase sobre sinigrina em flores do que em folhas da planta selvagem (Fig. 7, artigo). A menor atividade de mirosinase nas folhas do mutante *coi1* em relação às folhas de plantas selvagens, ambas sem expressão das *MBPs1* e 2, poderia representar a expressão mais baixa da mirosinase *TGG1* nos tecidos da planta mutante (Fig. 4, artigo), ou a associação de outra isoforma de MBP à mirosinase na folha da planta selvagem. A atividade maior de mirosinase em flores do que em folhas de plantas selvagens poderia refletir a presença das *MBPs1* e 2 nas flores, que de alguma maneira facilitariam a atividade das mirosinases sobre o substrato estudado. Essas hipóteses necessitam de investigação mais detalhada para serem comprovadas. A preparação do extrato protéico realizada não pressupõe a

separação das isoformas de mirosinase presentes em *Arabidopsis*, e só testamos a atividade do extrato sobre um substrato. Devido à variedade de glicosinolatos existentes, não sabemos se as diferenças observadas na atividade de mirosinase sobre sinigrina se repetiriam com outros substratos, e se os resultados seriam reproduzidos com as isoformas de mirosinase purificadas. Uma maneira simples de testarmos a interferência de MBP sobre a atividade de mirosinases seria avaliar o efeito da adição de açúcares (galactose, *N*-acetilglicosamina, manose) sobre a atividade da enzima. Uma alteração na atividade da mirosinase devido à adição de um açúcar pode sugerir uma ruptura da interação pré-existente da MBP com os carboidratos da mirosinase. Outra forma de investigarmos a associação de mirosinases e MBPs seria promover a expressão das duas proteínas *in vitro* e a análise da atividade de mirosinase sobre vários substratos, bem como a determinação dos produtos formados, na presença e ausência das MBPs.

A expressão das MBPs1 e 2 especificamente em flores, e a sua dependência do gene *COI1* (Fig. 1 e 4, artigo) sugerem que a sinalização dos jasmonatos é necessária para que ocorra a transcrição desses genes. Em folhas, no entanto, MeJA não é capaz de induzir a expressão dessas MBPs. Poderíamos supor que a transcrição das MBPs1 e 2 depende de um fator relacionado aos jasmonatos, ausente na flor da planta *coi1*, em conjunto com um fator específico do tecido e do estágio de desenvolvimento. Dessa forma, mesmo que na folha da planta selvagem a sinalização dos jasmonatos esteja intacta, não existem os fatores específicos do tecido e do estágio de desenvolvimento necessários para promover a indução da expressão das MBPs1 e 2 (Fig. 10). A homologia de COI1 com proteínas que participam do processo de ubiquitinação nas células (Xie *et al.*, 1998) sugere que a proteína COI1 seqüestra um repressor dependente dos jasmonatos nas flores de plantas selvagens, liberando a transcrição das MBPs1 e 2 (Fig. 10). A busca de elementos *cis* na região promotora das MBPs existentes em *Arabidopsis*, e de fatores de transcrição que promovam especificidade de expressão em determinados tecidos, estágios do desenvolvimento e em resposta a diferentes estresses e hormônios, são dois aspectos que merecem ser estudados nesta família de proteínas.

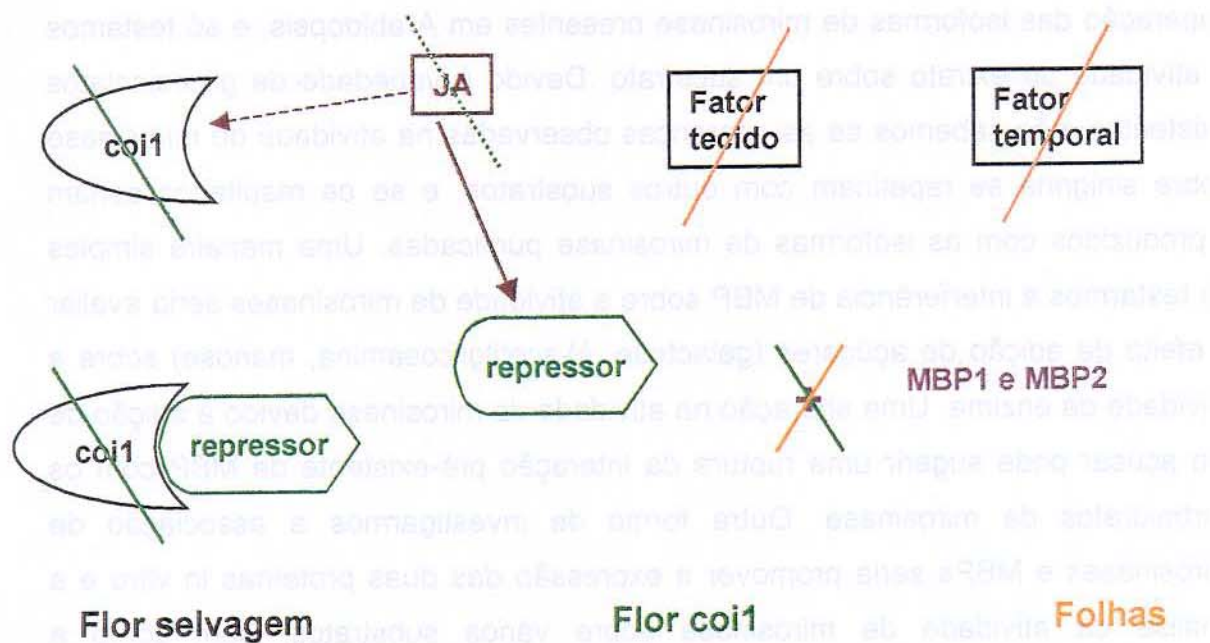


Figura 10- Regulação da expressão das *MBPs1* e *2* em diferentes órgãos. Na flor selvagem, a sinalização dos jasmonatos está intacta, a proteína COI1 está presente e seqüestra um repressor da transcrição dos genes *MBP1* e *2*, e existem os fatores tecido-específico (Fator tecido) e de desenvolvimento (Fator temporal). Como consequência, os genes *MBP1* e *MBP2* são transcritos (+). Na flor da planta *coi1*, a proteína COI1 está alterada, e o repressor impede a transcrição dos genes *MBPs* (↘). Nas folhas, embora a sinalização dos jasmonatos esteja intacta e a proteína COI1 presente, ambos os fatores tecido-específico e de desenvolvimento, ou apenas um deles, está ausente e dessa maneira não ocorre a transcrição das *MBPs* (↘).

A correspondência da expressão da *MBP1* e de *TGG1* nos primeiros estágios do desenvolvimento floral (Fig. 4, artigo), e a atividade maior da mirosinase sobre sinigrina no tecido no qual as MBPs estão expressas (Fig. 7, artigo), são evidências que corroboram a associação de mirosinase e MBPs. No entanto, a ausência de expressão da mirosinase *TGG1* e a presença de transcritos de *MBP1* nos órgãos masculinos da flor de *Arabidopsis* (Xue *et al.*, 1995, artigo), sugerem que a *MBP1* pode realizar suas funções independentes do complexo mirosinase-glicosinolato. Futuras investigações sobre a localização da expressão da mirosinase nas flores permitirão esclarecer se existe co-localização

de MBPs e mirosinases nos mesmos tipos celulares, e dessa forma confirmar ou não a associação entre as duas proteínas.

A expressão das *MBPs1* e 2 apenas em flores da planta selvagem, mas não nas flores macho-estéreis do mutante *coi1* (Fig. 1 e 4, artigo), e a incapacidade de MeJA em promover indução efetiva das *MBPs* estudadas (Fig. 5, artigo), sugerem uma função do complexo mirosinase-glicosinolato no desenvolvimento floral, e não em respostas de defesa. As análises de hibridização *in situ* da *MBP1* (Fig. 6, artigo) mostraram a expressão desse transcrito nos órgãos femininos e masculinos da flor, principalmente nos estágios iniciais de seu desenvolvimento (Fig. 4 e 6, artigo). A ausência de expressão das *MBPs* e a menor atividade de mirosinase na flor do mutante *coi1* estão de acordo com a insensibilidade a MeJA do mutante, e poderiam estar relacionadas com a sua macho-esterilidade. No entanto, faltam informações que nos permitam avaliar a veracidade dessa hipótese. Para prosseguir na caracterização da função das *MBPs* nas flores será muito interessante tentar a superexpressão e o silenciamento das *MBPs*, através da transformação de *Arabidopsis* com construções específicas para as duas isoformas descritas no trabalho. Até o momento, obtivemos os plasmídeos com as orientações sense e antisense do cDNA da *MBP1*, e transformamos as agrobactérias. Depois de várias tentativas de transformação de *Arabidopsis*, obtivemos duas plantas transformadas com a construção sense da *MBP1* selecionadas pela resistência à canamicina. A caracterização do fenótipo das plantas transformadas deverá incluir a análise de “Northern blot”, a medida da atividade de mirosinase sobre vários substratos, além de um estudo sobre níveis de herbivoria das plantas selvagens, mutante *coi1*, e transformadas.

Conclusões

Dois clones de cDNA homólogos às proteínas ligantes de mirosinase (MBPs) foram identificados em *Arabidopsis thaliana* através da técnica de “differential display” de mRNA.

Os transcritos de *MBP1* e *MBP2* são expressos apenas em flores de plantas selvagens, e não nas flores macho-estéreis do mutante *coi1*. Os transcritos de *MBP1* são expressos em vários órgãos florais, incluindo ovários, óvulos, estigma, anteras e filamento.

O gene *TGG1*, que codifica uma isoforma de mirosinase de *Arabidopsis*, tem padrão de expressão semelhante ao observado para os genes *MBP1* e *MBP2* durante o desenvolvimento floral, acumulando-se nos estágios iniciais. *TGG1* é expresso também em tecidos vegetativos, e sua expressão é apenas parcialmente afetada pelo gene *COI1*.

A atividade de mirosinase sobre sinigrina é maior em flores e folhas de plantas selvagens, do que nas plantas *coi1*.

O trabalho acrescenta evidências aos dados existentes na literatura, reforçando a idéia da participação das MBPs no complexo mirosinase-glicosinolato.

O gene *COI1* regula a expressão das MBPs em flores, e afeta significativamente a expressão e a atividade de mirosinase em *Arabidopsis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiello L.P., Robinson G.S., Lin Y.W., Nishio Y., King G.L.** (1994) Identification of multiple genes in bovine retinal pericytes altered by exposure to elevated levels of glucose by using messenger-RNA differential display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6231-6235.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K** (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Bauer D., Müller H., Reich J., Riedel H., Ahrenkiel V., Warthoe P., Strauss M.** (1993) Identification of differentially expressed mRNAs species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* **21**, 4272-4280.
- Bender C. L., Alarcón-Chaidez F., Gross D.C.** (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* **63**, 266-292.
- Bender C.L., Liyanage H., Palmer D., Ullrich M., Young S., Mitchell R.** (1993) Characterization of the genes controlling the biosynthesis of the polyketide phytotoxin coronatine including conjugation between coronafacic and coronamic acid. *Gene* **133**, 31-38.
- Benedetti C. e Arruda P.** (2001) Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-chlorophyllide ratio. *Submetido à publicação*.
- Benedetti C.E., Costa C.L., Turcinelli S.R., Arruda P.** (1998) Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *Coi1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **116**, 1037-1042.
- Benedetti C.E., Xie D., Turner J.G.** (1995) COI-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol.* **109**, 567-572.
- Berger S., Bell E., Mullet J.E.** (1996) Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *AtVsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* **111**, 525-531.

- Berger S., Bell E., Sadka A., Mullet J.E.** (1995) *Arabidopsis thaliana* AtVsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid-phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Mol. Biol.* **27**, 933-942.
- Blechert S., Bockelmann C., Füßlein M., Schrader T.V., Stelmach B., Niesel U., Weiler E.W.** (1999) Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* **207**, 470-479.
- Blechert S., Brodschelm W., Hölder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Xia Z.-Q., Zenk M.H.** (1995) The octadecanoid pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4099-4105.
- Bones A.M. and Rossiter J.T.** (1996) The myrosinase-glicosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol. Plant.* **97**, 194-208.
- Budde I. P e Ullrich M.S.** (2000) Interactions of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea with host and nonhost plants in relation to temperature and phytotoxin sybthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 951-961.
- Capella A.N., Menossi M., Arruda P., Benedetti C.E.** (2001) COI1 affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. *Planta* **213**, 691-699.
- Chang S.S., Park S.K., Kim B.C., Kang B.J., Kim D.U., Nam H.G.** (1994) Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. *Plant J.* **5**, 551-558.
- Chew F.S.** (1988) Searching for defensive chemistry in the Cruciferae, or, Do glucosinolates always control interactions of Cruciferae with their potential herbivores and simbionts? No! Pags.81-111, em K.A. Spencer, ed. Chemical Mediation of Coevolution. Academic Press, New York.
- Conconi A., Smerdon M.J., Howe G.A., Ryan C.A.** (1996) The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* **383**, 826-829.
- Costa C.L., Arruda P., Benedetti C.E.** (2000) An *Arabidopsis* gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases. *Plant Mol. Biol.* **44**, 61-71.

- Creelman R.A. e Mullet J. E.** (1997) Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* **9**, 1211-1233.
- 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. U.S.A.* **92**, 4114-4119.
- Czapski J. e Saniewski M.** (1992) Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme-activity in fruits of the non-ripening *Nor* and *Rin* tomato mutants by methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* **139**, 265-268.
- Dewdney J., Conley T.R., Shih M.-C., Goodman H.M.** (1993) Effects of blue and red light on expression of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **103**, 1115-1121.
- Falk A., Ek B., Rask L.** (1995a) Characterization of a new myrosinase in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **27**, 863-874.
- Falk A., Taipalensuu J., Ek B., Lenman M., Rask L.** (1995b) Characterization of rapeseed myrosinase-binding protein. *Planta* **195**, 387-395.
- Farmer E.E., Weber H., Wollenweider S.** (1998) Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. *Planta* **206**, 167-174.
- 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. U.S.A.* **87**, 7713-7716.
- Feys B.J., Benedetti C.E., Penfold C.N., Turner J.G.** (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759.
- García- Ponce B. e Rocha-Sosa M.** (2000) The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multi-functional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Science* **157**, 181-190.
- Geshi N. e Brandt A.** (1998). Two jasmonate-inducible myrosinase-binding proteins from *Brassica napus* L. seedlings with homology to jacalin. *Plant* **204**, 295-304.

- Geshi N, Andreasson E, Meijer J, Rask L, Brandt A** (1998) Co-localization of myrosinase- and myrosinase-binding proteins in grains of myrosin cells in cotyledon of *Brassica napus* seedlings. *Plant Physiol Biochem* **36**, 583-590.
- Gundlach H, Müller M.J., Kutchan T.M., Zenk M.H.** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 2389-2393.
- Haughn G.W., Davin L., Gibbin M., Underhill E.W.** (1991) Biochemical genetics of plant secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **97**, 217-226.
- Howe G.A., Lightner J., Browse J., Ryan C.A.** (1996) An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**, 2067-2077.
- Hooyakaas P.J.J.** (1988) Agrobacterium molecular genetics. Pags. 1-13, em Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S., eds. Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- James D.C. e Rossiter J.T.** (1991) Development and characteristics of myrosinase in *Brassica napus* during early seedling growth. *Physiol Plant* **82**, 163-170.
- Karban R., Baldwin I.T., Baxter K.J., Laue G., Felton G.W.** (2000) Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* **125**, 66-71.
- Kelly P.J., Bones A., Rossiter J.T.** (1998) Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* **206**, 370-377.
- Kim S.-R., Choi J.-L., Costa M.A., An G.** (1992) Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter. *Plant Physiol* **99**, 627-631.
- Koch T., Krumm T., Jung V., Engelberth J., Boland W.** (1999) Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol.* **121**, 153-162.
- Kwon H.-B., Park S.-C., Peng H.-P., Goodman H.M., Dewdney J., Shih M.-C.** (1994) Identification of a light-responsive region of the nuclear gene encoding the B subunit of chloroplast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **105**, 357-367.

- Laxalt A.M., Cassia R.O., Sanllorenti P.M., Madrid E.A., Andreu A.B., Daleo G.R., Conde R.D., Lamantina L.** (1996) Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Mol. Biol.* **30**, 961-972.
- Lee J., Vogt T., Schimdt J., Parthier B., Löbner M.** (1997) Methyljasmonate-induced accumulation of coumaroyl conjugates in barley leaf segments. *Phytochemistry* **44**, 589-592.
- Lenman M., Falk A., Rodin J., Hoglund A.-S., Ek B., Rask L.** (1993) Differential expression of myrosinase gene families. *Plant Physiol.* **103**, 701-711.
- Lenman M., Rodin J., Josefsson L.G., Rask L.** (1990) Immunological characterization of rapeseed myrosinase. *Eur. J. Biochem.* **194**, 747-753.
- Liang P. and Pardee A.B.** (1994) Differential display of mRNA by PCR. In Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., eds (New York: John Wiley & Sons), pp 15.8.01-15.8.07.
- Liang P., Averboukh L., Pardee A.B.** (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3269-3275.
- Liang P. e Pardee A.B.** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- Lillo C.** (1993) Light-induced circadian-rhythms in NADP⁺-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase messenger-RNA in corn seedlings. *J. Interdiscipl. Cycle* **24**, 65-71.
- Martín M., León J., Damman C., Albar J.-P., Griffiths G., Sánchez-Serrano J.J.** (1999) Antisense-mediated depletion of potato leaf ω 3 fatty acid desaturase lowers linolenic acid content and reduces gene activation in response to wounding. *Eur. J. Biochem.* **262**, 283-290.
- Mason H.S., DeWald D.B., Mullet J.E.** (1993). Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. *The Plant Cell* **5**, 241-251.
- Mathews C.K. e van Holde K.E.** (1990) Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City.

- McConn M., Creelman R.A., Bell E., Mullet J.E., Browse J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5473-5477.
- McConn M. e Browse J.** (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* **8**, 403-416.
- Milligan S.B. e Grasser C.S.** (1995) Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato. *Plant Mol. Biol.* **28**, 691-711.
- Mou L., Miller H., Li J., Wang E., Chalifour L.** (1994) Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 564-569.
- Mueller M.J.** (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant.* **100**, 653-663.
- Murashige T. e Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 493-497
- Narváez-Vásquez J., Florin-Christensen J., Ryan C.A.** (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**, 2249-2260.
- Orozco-Cardenas M., McGurl B., Ryan C.A.** (1993) Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8273-8276.
- Palmer D.A. e Bender C.L.** (1995). Ultrastructure of tomato leaf tissue treated with the Pseudomonad phytotoxin Coronatine and comparison with methyl jasmonate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 683-692.
- Parchmann S., Gundlach H., Mueller M.J.** (1997) Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* **115**, 1057-1064.
- Penninckx I.A.M.A., Thomma B. H.J., Buchala A., Métraux J.-P., Broekaert W.F** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.

- Pieterse C.M.J., van Pelt J.A., Ton J., Parchmann S., Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J.-P., van Loon L.C. (2000)** *Physiol. Plant Mol. Pathol.* **57**, 123-134.
- Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., van Pelt J.A., Knoester M., Laan R, Gerrits H., Weisbeek P.J., van Loon L.C. (1998)** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571-1580.
- Rakwal R., Tamogami S., Kodama O. (1996)** Role of jasmonic acid as a signaling molecule in copper chloride-elicited rice phytoalexin production. *Biosci. Biochem. Biochem.* **60**, 1046-1048.
- Rask L, Andréasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J (2000)** Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* **42**, 93-113.
- Reinbothe S., Mollenhauer B., Reinbothe C. (1994a)** JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* **6**, 1197-1209.
- Reinbothe S., Reinbothe C., Heintzen C., Seidenbecher C., Parthier B. (1994b)** JIP 60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7012-7016.
- Reinbothe S., Reinbothe C., Parthier B. (1993a)** Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome). *J. Biol. Chem.* **268**, 10606-10611.
- Reinbothe S., Reinbothe C., Heintzen C., Seidenbecher C., Parthier B. (1993b)** A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley. *EMBO J.* **12**, 1505-1512.
- Samach A., Broday L., Hareven D., Lifschitz E. (1995)** Expression of an amino acid biosynthesis gene in tomato flowers: developmental upregulation and MeJa response are parenchyma-specific and mutually compatible. *Plant J.* **8**, 391-406.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press).

- Schaller A., Bergey D.R., Ryan C.A.** (1995) Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. *Plant Cell* **7**, 1893-1898.
- Schindler U., Menkens A.E., Beckman H., Ecker J.R., Cashmore A.R.** (1992) Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expresses Arabidopsis GBF bZIP proteins. *EMBO J.* **11**, 1261-1273.
- Seo S., Okamoto M., Seto H., Ishizuka K., Sano H., Ohashi Y.** (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**, 1988-1991.
- Sharan M., Taguchi G., Gonda K., Jouke T., Shimosaka M., Hayashida N., Okazaki** (1998) Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science* **132**, 13-19.
- Sheng J., Luo Y., Wainwright H.** (2000) Studies on lipoxygenase and the formation of ethylene in tomato. *J. Hort. Sci. & Biotechnol.* **75**, 69-71.
- Shih M.-C., Heinrich P.C., Goodman H.M.** (1991) Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **104**, 133-138.
- Shikita M., Fahey J.W., Golden T.R., Holtzclaw D., Talalay P.** (1999) An unusual case of "uncompetitive activation" by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochem. J.* **341**, 725-732.
- Skowrya D., Craig K.L., Tyers M., Elledge S.J., Harper J.W.** (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell* **91**, 209-219.
- Staswick P.E., Su W., Howell S.H.** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6837-6840.
- Stintzi A. & Browse J.** (2000) The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10625-10630.
- Stotz H.U., Pittendrigh B.R., Kroymann J., Weniger K., Fritsche J., Bauke A., Mitchell-Olds T.** (2000) Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of Arabidopsis against

- egyptian cotton worm but not diamondback moth. *Plant Physiol.* **124**, 1007-1017.
- Taipalensuu J, Eriksson S, Rask L** (1997a) The myrosinase-binding protein from *Brassica napus* seeds possesses lectin activity and has a highly similar vegetatively expressed wound-inducible counterpart. *Eur J Biochem* **250**, 680-688.
- Taipalensuu J, Andreasson E, Eriksson S, Rask L** (1997b) Regulation of the wound-induced myrosinase associated protein transcript in *Brassica napus* plants. *Eur J Biochem* **247**, 963-971.
- Taipalensuu J, Falk A, Ek B, Rask L** (1997c) Myrosinase-binding proteins are derived from a large wound-inducible and repetitive transcript. *Eur J Biochem* **243**, 605-611.
- Tamogami S., Rakwal R., Kodama O.** (1997) Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of narigenin-7-o-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) *FEBS Letters* **401**, 239-242.
- Thangstad O.P., Evjen K., Bones A.** (1991) Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae. *Protoplasma* **161**, 85-93.
- Thangstad O.P., Winge P., Husebye H., Bones A.** (1993) The myrosinase (thioglucoside glucohydrolase) gene family in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* **23**, 511-524.
- Thomma B.P.H.J., Eggermont K., Penninckx I.A.M.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A., Broekaert W.F.** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15107-15111.
- Titarenko E., Rojo E., Léon J., Sánchez-Serrano J.J.** (1997) Jasmonic acid-dependent and-independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**, 817-826.
- Tsuchiya T., Ohta H., Okawa K., Iwamatsu A., Shimada H., Masuda T., Takamiya K.** (1999) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 15362-15367.

- Ueda J. e Kato J.** (1980) Isolation and identification of a senescence promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthum* L.) *Plant Physiol.* **66**, 246-249.
- van der Fits L., Zhang H., Menke F. L.H., Deneka M., Memelink J.** (2000) A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene Str and is induced by elicitor via a JA-independent signal transduction pathway. *Plant Mol. Biol.* **44**, 675-685.
- Verwoerd T.C., Dekker B.M.M., A. Hoekema** (1989) A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2362.
- Vick B.A. e Zimmermann D.C.** (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 470-477.
- Vijayan P., Shockey J., Lévesque C.A., Cook R.J., Browse J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7209-7214.
- Ward K.A., Tung P., Lamb N., Abrams S.R., Reid D.M., Moloney M.M., Holbrook L.A.** (1999) Structural requirements for biologically active jasmonates: Induction of protease inhibitors and cotyledon senescence. *Plant Growth Regul.* **27**, 49-56.
- Wasternack C., Ortel B., Miersch O., Kramell R., Beale M., Greulich F., Feussner I., Hause B., Krumm T., Boland W., Parthier B.** (1998) Diversity in octadecanoid-induced gene expression of tomato. *J. Plant Physiol.* **152**, 345-352.
- Wasternack C. e Parthier B.** (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Elsevier Science* **2**, 302-307.
- Watanabe K., Kamo T., Nishikawa F., Hyodo H.** (2000) Effect of methyl jasmonate on senescence of broccoli florets. *J. Japan. Soc. Hort.Sci.* **69**, 605-610.
- Weber H., Vick B.A., Farmer E.E.** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10473-10478.
- Wiebe W.L. e Campbell R.N.** (1993) Characterization of *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* and comparison with P-S tomato. *Plant Disease* **77**, 414-419.

- Xie D.-X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M, Turner J.G. (1998)** *COI1*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Xue J., Jorgensen M., Pihlgren U., Rask L. (1995)** The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization, expression and evolution. *Plant. Mol. Biol.* **27**, 911-922.
- Xue J., Lenman M., Falk A., Rask L. (1993)**. Temporal, cell-specific, and tissue-preferential expression of myrosinase genes during embryo and seedling development in *Sinapis alba*. *Planta* **191**, 95-101.
- Xue J., Lenman M., Falk A., Rask L. (1992)** The glucosinolate-degrading enzyme myrosinase in Brassicaceae is encoded by a gene family. *Plant Mol. Biol.* **18**, 387-398.