

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Milton Massao Shimizu

**POLIFENOLOXIDASE COMO FATOR DE
RESISTÊNCIA DA SOJA A NEMATÓIDES E NA
OXIDAÇÃO DO PALMITO**

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do Título de Doutor em
Biologia Vegetal.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família por toda a ajuda e o apoio em todas as horas.

Ao curso de Pós Graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pela orientação.

Aos Pesquisadores Científicos Roberto Kazuhiro Kubo e Dr. Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira, do Instituto Biológico, pela orientação inicial na obtenção de inóculos de nematóides e por ajudar a solucionar os problemas com a produção de inóculo de *Heterodera glycines*.

À Pesquisadora Científica Marilene Leão Alves Bovi, do Instituto Agronômico de Campinas, por fornecer as mudas de palmiteiros e pelas orientações sobre esta cultura.

Ao Antonio Marchi S. Trentini, que começou todo o trabalho com PPO de palmito.

Ao assessor da Fapesp para minha bolsa, que muito contribuiu para a melhoria do trabalho.

À FAPESP, pela bolsa e o apoio financeiro dados para a realização deste trabalho.

A Dulcinéia Martins de Albuquerque pela atenção e pelo sequenciamento das PPOs.

A Ana Paula Dias Demasi e Carla Cristina Judice Maria pela ajuda com o Southern e o Northern blot.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal (professores, funcionários e alunos) que me ajudaram a finalizar esta tese, em especial à Dulce, que me trouxe ao departamento e foi com quem tudo começou.

Agradeço de coração a todos que conviveram comigo, dentro e fora desta UNICAMP, ao longo de todos estes anos.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE	ii
RESUMO	vi
SUMMARY	viii
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I	
“POLIFENOLOXIDASE NA RESISTÊNCIA DE SOJA AOS NEMATÓIDES	
<i>Meloidogyne javanica</i> E <i>Heterodera glycines</i>”	
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Papel da polifenoloxidase em plantas	9
1.2. Resposta de plantas a nematóides	11
1.3. <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Heterodera glycines</i>	15
1.4. PPO e a resistência de plantas a nematóides	16
2. OBJETIVO	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material vegetal e nematóides	20
3.2. Medidas de atividade de PPO	20
3.2.1. Extração e tampão de reação	20
3.2.2. Testes de substratos e atividade na raiz	21

3.3. Avaliação do dano mecânico, do metiljasmonato e da infecção de nematóides na atividade da PPO de raiz de soja	21
3.3.1. Dano Mecânico	22
3.3.2. Metiljasmonato	22
3.3.3. Nematóides	23
3.4. Manipulação de ácidos nucleicos	23
3.4.1. Extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA	23
3.4.2. Primers, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase	24
3.4.3. Clonagem dos fragmentos	25
3.4.4. Southern blot	26
3.4.5. Northern blot	26
3.5. Ensaio integrado	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Extração da PPO e testes de substratos e raízes	30
4.2. PPO e dano mecânico	32
4.3. PPO e metiljasmonato	34
4.4. PPO e inoculação com nematóides	35
4.5. Manipulação de ácidos nucleicos	37
4.6. Southern blot	40
4.7. Northern blot	43
4.8. Ensaio integrado	44

4.8.1. Fenóis em raiz de soja tratada com metiljasmonato e inoculados com nematóides	44
4.8.2. Atividade e expressão da PPO	47
4.8.3 Efeito do metiljasmonato em soja infectada com nematóides	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
6. APÊNDICE	66

CAPÍTULO II

“ATIVIDADE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE POLIFENOLOXIDASES DOS PALMITOS DAS PALMEIRAS JUÇARA (*Euterpe edulis*), AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea*) E PUPUNHEIRA (*Bactris gasipaes*)”

1. INTRODUÇÃO	68
1.1. O palmito	68
1.2. PPO em palmito	69
2. OBJETIVOS	74
3. MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1. Material vegetal	75
3.2. Extração, dosagem da atividade de PPO e estudos cinéticos	76
3.3. Extração de compostos fenólicos e determinações quantitativa e qualitativa	76
3.4. Determinação da variabilidade na atividade da PPO	77
3.5. “ <i>Tissue printing</i> ” de caules e reação para PPO	77
3.6. Manipulação de ácidos nucléicos	78

3.6.1. Extração de RNA total, síntese de cDNA e reações de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase	78
3.6.2. Clonagem de fragmentos e seqüenciamento	79
3.6.3. Análises do número de genes (Sourthern) e da expressão (Northern)	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1. Caracterização de PPO dos palmiteiros juçara, açazeiro e pupunheira	82
4.2. Compostos fenólicos e PPO	91
4.3. Isolamento de clones de PPO	95
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

RESUMO

A polifenoloxidase (PPO) há muito vem sendo estudada, seja na resistência em plantas a pestes e doenças, como também pela sua importância na indústria de alimentos.

O primeiro capítulo apresenta o estudo da PPO da raiz de soja das variedades Cristalina (suscetível) e Hartwig (resistente) submetidas a dano mecânico, tratadas com metiljasmonato e infectadas com os nematóides *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*. Antes porém, uma rápida caracterização da PPO de soja mostrou que o triton X-100 aumentava a eficiência de extração, o dodecilsulfato de sódio (SDS) não aumentava a atividade e o ácido clorogênico era o melhor substrato da enzima. Nas plantas submetidas a dano mecânico e tratadas com metiljasmonato houve aumento da atividade da PPO, principalmente em Hartwig. Foi nesta variedade também a maior atividade detectada com a inoculação dos dois nematóides. As análises de fenóis totais não mostraram diferenças quantitativas ou qualitativas entre os tratamentos. Nos estudos moleculares foram isolados inicialmente cinco clones de PPO de raiz de soja, mas apenas dois destes fragmentos, JH1 e JH2, foram usados no preparo de sondas para estudos de Southern blot, que mostraram até 4 genes codificando para PPO. A análise de expressão por RT-PCR mostrou o aumento de transcrição somente com JH1, o que sugere que os genes para PPO não respondem da mesma forma ao mesmo estímulo. Cristalina tratada com metiljasmonato apresentou aumento de resistência a ambos os nematóides, enquanto em Hartwig não houve mudanças visíveis.

No segundo capítulo foram feitas análises da PPO em folhas novas e velhas, raízes e palmito das palmeiras juçara, açazeiro e pupunheira, onde maior atividade foi detectada em juçara, açazeiro e pupunheira, respectivamente. De modo geral, folhas novas apresentaram maior atividade do que as velhas, e estas, atividade um pouco maior do que raízes. Na

caracterização da PPO, o ácido clorogênico mostrou ser seu melhor substrato, com a melhor temperatura de reação entre 25°C (açázeiro e pupunha) e 30°C (juçara). As melhores atividades foram observadas entre pH 5,5 e 6,0 do meio de reação. Houve inibição por inibidores específicos, tais como ácido salicilhidroxâmico, brometo de cetiltrimetilamônia e tropoleno. Os K_i 's foram determinados para as PPOs de juçara e açázeiro com ácido salicilhidroxâmico (2,82 μ M e 1,96 μ M, respectivamente) e tropoleno (6,55 μ M e 1,25 μ M, respectivamente). SDS levou à perda de atividade da enzima. PPO de juçara e açázeiro mostrou-se relativamente resistente a temperaturas altas. O K_m para ácido clorogênico foi menor para pupunheira (0,59 mM), seguido de juçara (1,19 mM) e açázeiro (1,91 mM). Análises de fenóis solúveis totais e, ácido clorogênico mostraram que pupunha tem considerável quantidade de fenóis, semelhante até ao teor encontrado em açáí e um pouco superior a juçara, mas ácido clorogênico foi aproximadamente dez vezes menor em pupunha que nas outras duas palmeiras. “*Tissue printings*” de cortes do caule das palmeiras mostraram que pupunha apresenta pouca reação de oxidação devido à baixa atividade da enzima e não à uma possível menor quantidade de fenóis ou mais especificamente, de ácido clorogênico. Nos estudos moleculares, os mesmos primers detectaram seqüências de PPO em palmito de açázeiro e juçara. Apenas um foi comum com palmito da pupunheira. Foram isolados dois clones de PPO, PPOEd17 (juçara) e PPOAc45 (açáí). Não foi possível isolar nenhum clone de PPO de pupunha. Estes fragmentos apresentaram similaridade baixa entre eles, ao redor de 52%, e foram usados na fabricação das sondas usadas no Southern blot, que indicaram a presença de apenas um gene nas três palmeiras. A análise de expressão por RT-PCR detectou transcrição significativa apenas nos palmitos de juçara e açáí, mostrando que a baixa oxidação observada em palmito pupunha se deve à baixa expressão do gene codificando para essa enzima. Ainda assim, a falta de substrato específico, o CGA, não pode ser excluída como um

fator que contribui para a menor oxidação, pois as análises mostraram a presença de outros fenóis em pupunha em quantidades parecidas ou até superiores, mas que podem não ser tão bons substratos para a PPO, provocando a sua menor oxidação.

SUMMARY

Most of the studies on polyphenol oxidase (PPO) are concerned with its participation in the response of plants to insect attack and its importance in food quality.

The first chapter of this thesis presents the study of PPO from roots of two soybean (*Glycine max*) varieties differing in their resistance to nematodes. The aim was to study the role of PPO at the time of inoculation and consequently analyses were carried out at 6, 12, 24, 48 and 72 h after inoculation. Roots of Cristalina (susceptible) and Hartwig (resistant) were subjected to mechanical damage, treated with methyl jasmonate and inoculated with the nematodes *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines*. Initial tests showed that the presence of triton X-100 in the extraction buffer increased the efficiency of PPO extraction. Sodium dodecylsulfate (SDS) did not affect the enzyme activity and chlorogenic acid was the best substrate. Plants subjected to mechanical damage and treated with methyl jasmonate showed an increase of PPO activity, mainly in Hartwig. This variety also showed the highest activity following nematode inoculation. Analyses of phenolic compounds did not show quantitative or qualitative differences among the treatments. Using degenerate primers and PCR we isolated five clones of PPO from soybean root, but only two (JH1 and JH2) were used for Southern blot analysis. Probes made from these clones indicated 4 genes coding for PPO in soybean. Only JH1 showed an increase of PPO transcription with semi-quantitative RT-PCR

based expression analysis. The results suggest that different stimuli might induce transcription of different PPO genes in soybean. Cristalina treated with methyljasmonate showed an increase of resistance to both nematodes, while no changes were observed with Hartwig.

In the second chapter of this thesis PPO was studied in palm plants which differ in the oxidation of the extracted heart of palm (palmito). Analyses of PPO in young and mature leaves, roots and heart of palm showed that activity was higher in juçara (*Euterpe edulis*) and açaizeiro (*Euterpe oleraceae*). In general, the activity was higher in young tissues. Enzyme assay showed chlorogenic acid (CGA) as the best substrate and the best temperature reaction was 25°C for açaizeiro and pupunha (*Bactris gassipae*) and 30°C for juçara. The best activities of PPO were between pH 5.5 and 6.0. PPO was inhibited by specific inhibitors, such as salicylhydroxamic acid, cetyltrimethylammonium bromide and tropolone. Ki's were determined for salicylhydroxamic acid (1,96 µM for açai and 2.82 µM for juçara) and tropolone (1.25 µM for açai and 6.55 µM for juçara) with the PPOs from juçara and açaizeiro, respectively. SDS in the reaction medium led to the loss of activity of the enzyme. PPO of juçara and açaizeiro were relatively resistant to the temperature. The Km for chlorogenic acid was lower for pupunheira (0.53 mM), followed by juçara (1.19 mM) and açaizeiro (1.917 mM). Analyses of total soluble phenols and chlorogenic acid showed that pupunha has a considerable amount of phenols but a significantly lower amount of chlorogenic acid when compared with the other two palms. "Tissue printings" of cut stems of pupunha showed an absence of oxidation indicating that low activity of PPO and not low phenol was responsible for low oxidation of the heart of palm from this plant. Using degenerate primers and RT-PCR, two PPO clones were isolated, one from heart of palm of juçara (PPOEd17) and other from açaizeiro (PPOAc45). We were not able to isolate any clone from pupunha. These clones had low similarity (52%) and they were used as probes in Southern blot analysis. The results

indicated that only one PPO gene was present in the three palms. Using semi-quantitative RT-PCR based expression analysis it was possible to detect significant PPO transcription only in the heart of palm of juçara and açazeiro, confirming that that low the oxidation observed in pupunha is due to low expression of the gene coding for PPO. However, the low chlorogenic acid content cannot be excluded as another factor contributing to the lower oxidation in this palm, since other phenols present would not be as good substrates as CGA.

INTRODUÇÃO

A Enzima Polifenoloxidase

Polifenoloxidases (PPOs) são enzimas que catalisam duas reações distintas: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois (atividade de cresolase, tirosinase ou monofenol monooxigenase - EC 1.14.18.1) e a oxidação (desidrogenação) desses compostos para respectivas *o*-quinonas (atividade de catecolase ou difenol oxigênio oxireductase - EC 1.10.3.2).

A atividade da catecolase leva à formação de diferentes estados de oxidação de fenóis (figura 1). A forma fenólica permite a ligação com proteínas por interação hidrofóbica e por ponte de hidrogênio. Estes tipos de ligação têm baixa energia, sendo reversíveis. Por outro lado, a forma iônica (fenolato) e quinonas interagem covalentemente com proteínas, com energia entre 100 e 1000 kJ/mol, sendo irreversíveis (Appel, 1993).

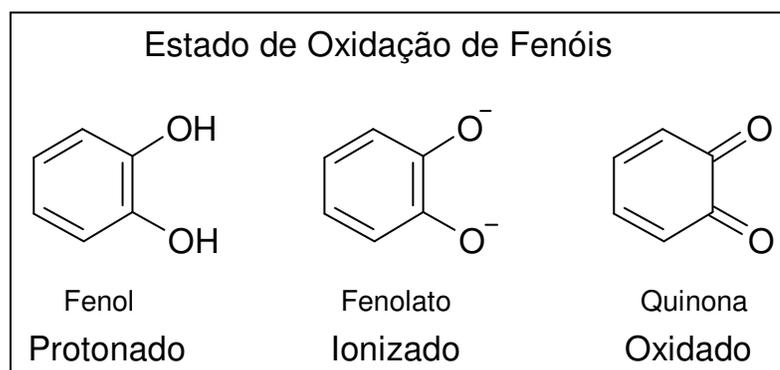


Figura 1. Diferentes estados de oxidação de fenóis decorrentes da atividade de catecolase de PPOs

PPOs são enzimas codificadas por genes nucleares e, apesar de estarem localizadas em plastídeos (Hunt *et al.*, 1993) e separadas de seus substratos, os compostos fenólicos, que estão localizados principalmente nos vacúolos, têm atividade só quando liberados no rompimento

celular. Em decorrência disso é que surge o que se acredita ser o principal papel dessas enzimas em plantas, ou seja, uma forma de defesa contra microorganismos, insetos e mamíferos herbívoros (Mayer & Harel, 1991; Harborne, 1991; Appel, 1993; Steffens *et al.*, 1994). Outras considerações sobre a função fisiológica de PPOs ainda não foram confirmadas (Vaughn *et al.*, 1988; Thygesen *et al.*, 1995; Thipyapong *et al.*, 1997). Devido à sua alta afinidade por oxigênio, tem sido proposto que PPOs podem atuar na fotofosforilação pseudocíclica (tendo oxigênio comoceptor final de elétrons, ao invés de NADP⁺) e regular o nível de oxigênio plastídico (Vaughn & Duke, 1984; Trebst & Depka, 1995). Também, o cofracionamento de PPO com o fotossistema II (PS-II) sugere seu envolvimento, em algum aspecto, no metabolismo de cloroplastos (Lax & Vaughn, 1991), além de PPO poder interagir com PS-II, competindo por oxigênio com a proteína 23 kDa do sistema liberador de oxigênio, para o transporte para o lúmen (Hind *et al.*, 1995).

PPOs são normalmente encontradas em uma variedade de tecidos e órgãos, e maior atividade é encontrada em tecidos em estádios iniciais de desenvolvimento, onde também a quantidade de fenóis é alta (Mayer & Harel, 1991; Hunt *et al.*, 1993; Dry & Robinson, 1994; Sommer *et al.* 1994; Thygesen *et al.*, 1995; Bucheli *et al.*, 1996).

A questão de isoformas de PPO é também um ponto que deve ser considerado, uma vez que este parâmetro vem sendo bastante utilizado para estabelecer relações genéticas entre plantas, pelo padrão de bandas separadas em eletroforese. Em muitas plantas nas quais têm sido detectadas múltiplas formas de PPO, por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) ou focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF), não é seguro afirmar que o número observado de bandas é produto do mesmo número de genes. A razão disto é que PPO reage prontamente com quinonas e também sofre proteólise sem perder atividade (Steffens *et al.*, 1994). Assim, em um mesmo gel podem ser observadas diferentes bandas, que na verdade

poderiam ser de uma mesma proteína que sofreu alterações. Harel *et al.* (1973) demonstraram que parte da suposta multicplidade de formas de PPO poderia ser reproduzida com proteases obtidas comercialmente. Desta forma, talvez em vários trabalhos, parte das isoformas fossem artefatos de isolamento e purificação, gerados por alquilação com quinonas e proteólise parcial. Recentemente, um grupo espanhol mostrou em banana que a eliminação de fenóis dos extratos gerava apenas uma banda de atividade, ao contrário do que se tinha observado em trabalhos anteriores com PPO nesta planta (Sojo *et al.*, 1998)

Porém, muitas plantas parecem possuir pequena família multigene de PPOs, que são expressas em diferentes tempos (estádios de desenvolvimento) ou tecidos específicos. Em tomateiro demonstrou-se que a PPO é codificada por sete genes bastante conservados (Thipyapong *et al.*, 1997). Usando sondas específicas capazes de reconhecer PPO A/C, PPO B, PPO D e PPO E/F, estes autores mostraram que sempre existia a predominância de uma isoforma em determinado tecido e/ou em determinado estágio de desenvolvimento da planta. Por exemplo, PPO B era predominante em folhas jovens. Mesmo em diferentes tipos de tricomas foi possível diferenciar formas predominantes.

Em batata (*Solanum tuberosum*) isolaram cinco clones de PPO bastante conservados a partir do RNA deste tubérculo (Thygesen *et al.*, 1995). Apesar de isolados de um mesmo tecido, isto não significa que os genes apresentam expressões semelhantes, sendo observado, por exemplo, que o clone POT32 de batata, era o que mais se expressava em todas as partes do tubérculo. Já, o POT33 expressava-se muito mais nas regiões próximas à casca do tubérculo. Esta expressão diferencial, ou seja, em tempo e local, é que faz todos que trabalham com PPO se perguntarem qual a função desta enzima em plantas?

Ao contrário de batata e tomate, uvas parecem possuir apenas um gene de PPO (Rathjen & Robinson, 1992). Outro exemplo que pode ser dado é o de *Phytolacca americana*

(pokeweed). Joy *et al.* (1995) isolaram dois clones desta planta e observaram que sua expressão ocorria apenas em frutos ricos em betalaínas. Bucheli *et al.* (1996) isolaram um clone de PPO de cana de açúcar e observaram que este se expressava principalmente na região de crescimento apical e no tecido ainda imaturo, logo abaixo do ápice. Em tecidos maduros, como folhas e caule, não foi detectado sinal do mRNA específico. Em *Vicia faba*, Cary *et al.* (1992) isolaram três clones, cujas diferenças nas seqüências também indicavam fazerem parte de uma família de genes. As seqüências eram bastante conservadas.

Comparando a PPO de diferentes espécies vegetais, temos em comum dois sítios de ligação de cobre bastante conservados, formando o sítio catalítico da enzima (Rescigno *et al.*, 1997; Eicken *et al.*, 1999). Devido a essa característica, vários primers utilizados nas ampliações para produção de fragmentos de PPO da maioria dos exemplos acima foram produzidos a partir de seqüências internas ou próximas a essa região de ligação de cobre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appel, H. M., 1993. Phenolics in ecological interactions – The importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.* 19:1521-1552.
- Bucheli, C. S., Dry, I. B. & Robinson, S. P., 1996. Isolation of a full-length cDNA encoding polyphenol oxidase from sugarcane, a C4 grass. *Plant Mol. Biol.* 31:1233-1238.
- Cary, J. W., Lax, A. R. & Flurkey, W. H., 1992. Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 20:245-253.
- Dry, I. B. & Robinson, S. P., 1994. Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 26:495-502.
- Eicken, C., Krebs, B & Sacchettini J. C., 1999. Catechol oxidase – structure and activity. *Curr. Opin. Structural Biol.* 9:677-683.
- Harborne, J. B., 1991. The chemical basis of plant defense. In: *Plant defenses against mammalian herbivory* (R.T. Palo & C.T. Robbins, ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, p.45-59.
- Harel, E., Mayer, A. M. & Lehman, E., 1973. Multiple forms of vitis-vinifera catechol oxidase. *Phytochemistry* 12:2649-2654.
- Hind, G., Marshak, D. & Coughlan, S., 1995. Spinach thylakoid polyphenol oxidase – cloning, characterization, and relation to a putative protein-kinase. *Biochemistry* 34:8157-8164.
- Hunt, M. D., Eannetta, N. T., Yu, H., Newman, S. M. & Steffens, J. C. 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 21:59-68.
- Joy, R. W., Sugiyama, M., Fukuda, H. & Komamine, A., 1995. Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* 107:1083-1089.
- Lax, A. R. & Vaughn, K. C., 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem-II-proteins. *Plant Physiol.* 96:26-31.

- Mayer, A. M. & Harel, E., 1991. Phenoloxidasas and their significance in fruit and vegetables. *In* Food Enzymology. Vol. 1. (P.F. Fox, ed.). Elsevier Applied Science, London, p.373-398.
- Rathjen, A. H. & Robinson, S. P., 1992. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.* 99:1619-1625.
- Rescigno, A., Sollai, F., Rinaldi, A. C., Soddu, G. & Sanjust, E., 1997. Polyphenol oxidase activity staining in polyacrylamide electrophoresis gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 34:155-159.
- Sojo, M. M., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 1998. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46:4924-4930.
- Sommer, A., Neeman, E., Steffens, J. C., Mayer, A. M. & Harel, E., 1994. Import, Targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 105(4):1301-1311.
- Steffens, J. C., Harel, E. & Hunt, M. D. 1994. Polyphenol oxidase. In: *Recent Advances in Phytochemistry Vol. 28. Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (B.E. ELLIS, G.W. KUROKI & H.A. STAFFORD, ed.). Plenum Press, New York, p.275-312.
- Thipyapong, P., Joel, D. M. & Steffens, J. C., 1997. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiol.* 113:707-718.
- Thygesen, P. W., Dry, I. B. & Robinson, S. P., 1995. Polyphenol oxidase in potato. a multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109:525-531.
- Trebst, A. & Depka, B., 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynt. Res.* 46:41-44.
- Vaughn K. C. & Duke S. O., 1984, Function of polyphenol oxidase in higher-plants. *Physiol.*

Plant. 60:106-112.

Vaughn, K. C., Lax, A. R. & Duke, S. O., 1988. Polyphenol oxidase-the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72:659-665.

CAPÍTULO I

“POLIFENOLOXIDASE NA RESISTÊNCIA DE SOJA AOS NEMATÓIDES

Meloidogyne javanica E *Heterodera glycines*”

1. INTRODUÇÃO

1.1. Papel da polifenoloxidase em plantas

O papel fisiológico da polifenoloxidase (PPO) em plantas tem sido relacionado à resistência ao ataque de insetos e microorganismos. Aparentemente, o dano causado pelo rompimento celular seria o responsável por este papel, ou seja, a liberação da enzima dos plastídeos e seu posterior contato com seus substratos, os fenóis liberados do vacúolo. Como resultado da oxidação dos fenóis seriam produzidas quinonas, compostos que são bastante reativos e que se ligariam irreversivelmente a proteínas. As quinonas podem atuar de duas formas na resistência. A primeira, diminuindo a qualidade da proteína da própria planta, pois o complexo proteína-quinona é menos digerível pelo trato digestivo de insetos, fazendo com que os mesmos tenham menor aproveitamento do nitrogênio e o comprometimento do crescimento. A segunda possibilidade é a ligação direta das quinonas com proteínas do trato digestivo dos insetos, diminuindo a sua funcionalidade.

No entanto, alguns estudos têm mostrado que genes de PPO são expressos em tecidos distantes àqueles submetidos a dano mecânico artificial (Boss *et al.*, 1995; Thipyapong *et al.*, 1995), o que indica que haveria algum tipo de sinalização entre as células danificadas e outras na vizinhança do local afetado. A indução provavelmente estaria ligada à produção de ácido jasmônico e seus derivados, pela ativação da via do ácido octadecanóico, com aumento da atividade da lipoxigenase (Constabel *et al.*, 1995; McConn *et al.*, 1997; Constabel & Ryan, 1998; Royo *et al.*, 1999). Rojas *et al.* (1993) inocularam folhas de cafeeiro com uma raça incompatível de ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*) e observaram aumento na atividade de lipoxigenase, sendo esta enzima envolvida na via de biossíntese do ácido jasmônico e seus derivados em plantas. Folhas de cafeeiro expostas a metiljasmonato, ou submetidas a dano

mecânico, apresentaram aumento na atividade da PPO (Mazzafera & Robinson, 2000).

Ainda em relação ao efeito do ácido jasmônico e seu derivado metiljasmonato, Vijayan *et al.* (1998) verificaram que um mutante de *Arabidopsis thaliana*, que não produzia estes compostos, era mais suscetível à podridão das raízes causada por *Phytophthora mastophorum*. Quando as raízes foram expostas ao produto, havia pouco desenvolvimento da doença. De outro modo, os mesmos autores observaram que mutantes insensíveis ao ácido jasmônico eram infectados quando tratados exogenamente com o produto.

Constabel & Ryan (1998) observaram que existia correlação positiva entre indução de PPO por ácido jasmônico e por dano mecânico, em folhas de 18 espécies de plantas, pertencentes a 5 famílias.

Em relação a insetos, um exemplo bastante convincente do papel de PPO na resistência é o trabalho de Felton *et al.* (1989), que demonstraram que a ligação de quinonas, formadas durante o ataque de lagartas de *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua* em tomateiro, com proteínas do próprio tecido vegetal levava à diminuição da qualidade nutritiva do tecido. Ou melhor, uma vez formado, o complexo quinona-proteína passa a não ser digerido eficientemente pelo inseto, causando menor desenvolvimento das lagartas. Além disso, foi observado que a secreção bucal das lagartas induzia aumento de atividade da PPO. Recentemente, por comparação de expressão de determinados genes de resistência, mostrou-se que o dano causado por lagartas se alimentando em plantas induzia maior expressão de genes do que o dano simulado (Korth & Dixon, 1997).

Apesar dos trabalhos indicando que variedades resistentes têm maior atividade constitutiva de PPO ou que ocorre maior aumento da atividade da enzima em tecidos infectados, ainda não foi oferecida uma prova definitiva do seu envolvimento na resistência. Correlação positiva entre PPO e resistência a *Pseudomonas syringae* pv. tomato foi encontrada

na avaliação de 20 variedades de tomateiros (Bashan *et al.*, 1985). Após a infecção houve aumento maior de PPO nas variedades resistentes. Maior atividade constitutiva também foi encontrada em tubérculos de batatas resistentes a *Fusarium sambucinum*, além de também ter sido observado aumento após a infecção pelo patógeno (Ray & Hammersmidt, 1998). O mesmo foi notado para um híbrido entre *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana debneyi*, quanto à resistência a *P. syringae* pv. tabaci, *P. syringae* pv. syringae, *Peronospora tabacina*, *Cercospora nicotianae*, *Chalara elegans* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Goy *et al.*, 1992). Folhas de cafeeiro resistente à ferrugem alaranjada também apresentaram maior atividade de PPO após a infecção por *H. vastatrix* (Maxemiuc-Naccache & Dietrich, 1985).

1.2. Resposta de plantas a nematóides

É indiscutível a importância dos nematóides na agricultura, uma vez que culturas de importância econômica infectadas apresentam queda de produção, chegando ao redor de US\$ 100 bilhões anuais (<http://www.snagricultura.org.br/arttec-nematoides.htm>).

Os nematóides podem ser divididos em duas grandes categorias de acordo com sua estratégia de alimentação: endo e ectoparasitas (Hussey & Williamson, 1998). Na categoria dos endoparasitas encontram-se os sedentários, que causam a vasta maioria dos danos, particularmente os pertencentes aos gêneros *Meloidogyne*, *Globodera* e *Heterodera*, e os migradores, como por exemplo, aqueles dos gêneros *Pratylenchus* e *Radopholus*. No caso de nematóides migratórios, larvas de segundo estágio (juvenis de segundo estágio - J2) penetram nas células das raízes e se alimentam enquanto migram. Ocorre destruição do tecido ao longo do caminho, uma vez que as células perfuradas pelo estilete do nematóide geralmente morrem após terem parte do seu conteúdo sugado. No caso de nematóides do gênero *Meloidogyne*, as larvas J2 penetram nas raízes e migram intercelularmente em direção ao meristema e

posteriormente mudam de direção e migram, quase que axialmente, para o tecido vascular, provocando poucos danos na planta durante o processo de infecção. Durante a migração existe a separação da lamela média entre as células, sendo ainda desconhecido se isto é um processo apenas mecânico, por ação do estilete, ou por liberação de enzimas hidrolíticas produzidas pelo nematóide (Wyss *et al.*, 1992). Ao atingirem o cilindro vascular, forma-se o sítio de alimentação, que consiste de células modificadas, com hiperplasia, conhecidas como células gigantes (Hansen *et al.*, 1996; Hussey & Williamson, 1998). No caso de nematóides dos gêneros *Globodera* e *Heterodera*, conhecidos como nematóides do cisto, os juvenis penetram as raízes na zona de alongamento, migrando intracelularmente, perfurando as células durante o trajeto até a proximidade do tecido vascular. Neste local, o estilete penetra uma célula, a qual irá se desenvolver o sítio de alimentação, conhecida como sincício (Hansen *et al.*, 1996; Hussey & Williamson, 1998). O sincício será formado pela coalescência de várias células, que terão suas paredes celulares digeridas parcialmente, formando um bloco único de alimentação com alterações no número e estrutura das organelas (Endo, 1992; Hansen *et al.*, 1996; Hussey & Williamson, 1998).

Por apresentarem um grau de especialização muito grande, com vários passos até o estabelecimento do nematóide na raiz, ou seja, da penetração até a formação do sítio de alimentação e depois sua reprodução, as possibilidades de mecanismos de defesa podem ocorrer em vários pontos durante o ciclo de vida (Opperman & Conkling, 1998). Assim, as respostas da planta poderiam se dar em duas categorias, como oriundas do estresse (dano) causado pelo nematóide durante sua migração, e a segunda, direcionada para a formação do sítio de alimentação. No entanto, poucos estudos foram feitos sobre genes específicos expressos na planta nestas duas etapas, sendo que a carência maior se relaciona à fase de formação do sítio de alimentação e, o mais importante, em interações compatíveis, já que não

ocorre a formação desta estrutura em interações incompatíveis. A idéia básica destes trabalhos é que, identificado algum gene essencial para a formação do sítio de alimentação, o seu silenciamento impediria o estabelecimento do nematóide.

Bird & Wilson (1994) isolaram mais de 200 cDNAs de células gigantes de *Meloidogyne incognita*. No entanto, a maioria foi identificada como genes expressos por dano (“wound expressed”), em plantas infectadas por diferentes patógenos. Exemplos são quitinases e glucanases, que normalmente apresentam atividade maior em plantas resistentes a nematóides após a infecção (Rahimi *et al.*, 1993; Oka *et al.*, 1997a; Baldrige *et al.*, 1998; Rahimi *et al.*, 1998). Genes codificando para extensinas também foram isolados de sítios de alimentação de *M. incognita* em tomateiro (Van der Eycken *et al.*, 1996). Também existem indicações de que enzimas relacionadas com mecanismos de proteção contra radicais tóxicos estejam envolvidas no processo de infecção (Niebel *et al.*, 1995; Molinari & Miacola, 1997). A natureza do dano mecânico causado pelo nematóide do cisto *Heterodera avenae* foi sugerida, sendo que uma proteína induzida pelo nematóide, de natureza não identificada, também foi induzida por ácido jasmônico em raízes de cevada (Oka *et al.*, 1997b).

Outra estratégia alternativa de estudos tem sido conduzida com promotores específicos para o processo de infecção. O caso mais estudado é o de *TobRB7*, isolado de tabaco infectado por *M. incognita*, que é ativado no sítio de alimentação (Opperman *et al.*, 1994). Também tem sido dada atenção à secreção liberada pelas glândulas esofágicas de nematóides, uma vez que profundas alterações ocorrem nas células vegetais quando penetradas pelo estilete (Hussey *et al.*, 1994; Hussey *et al.*, 2002).

Talvez o estudo mais representativo sobre a especificidade de expressão de genes durante as várias fases do processo de infecção e estabelecimento de nematóides em plantas tenha sido realizado com batatas infectadas com *Globodera pallida* e *Meloidogyne javanica*

(Hansen *et al.*, 1996). Plantas transgênicas produzidas com *Agrobacterium rhizogenes* contendo o promotor *wun1*, que pode ser induzido por dano, e o gene de β -glucuronidase (GUS), tiveram suas raízes expostas à infecção pelos dois nematóides em cultura livre de patógenos e a expressão de GUS verificada. Forte expressão foi observada com *G. pallida* durante a migração intercelular, ficando em seguida apenas restrita ao sítio de alimentação. Por outro lado, a expressão durante a migração de *M. javanica* foi bastante fraca, ficando forte na formação da galha. Portanto, houve expressão relacionada com fases distintas, em função do modo de colonização das raízes pelo nematóide.

Outro trabalho neste sentido foi conduzido com *M. javanica* infectando tomateiro e *H. avenae* infectando trigo e cevada (Oka *et al.*, 1997a). A falta de detecção de proteínas relacionadas à patogenicidade (pathogenesis related proteins - PR), tais como quitinase, glucanase e P14, na primeira interação foi justificada pelo modo como o nematóide infecta a planta, ou seja, intercelularmente e sem muitos danos às células, como também, ao contrário do sincício, pela formação do sítio de alimentação de *M. javanica*, no qual não ocorre dissolução de paredes celulares, o que poderia ativar uma reação de defesa.

Em trabalhos anteriores aos dois citados acima, observou-se que vários promotores de origem viral, bactéria e mesmo de plantas respondiam à infecção por nematóides (Goddijn *et al.*, 1993; Niebel *et al.*, 1993; Opperman *et al.*, 1994). No entanto, nestes casos a ativação dos promotores foi sempre associada aos sítios de alimentação.

Outro ponto a considerar na relação entre plantas e nematóides é a resposta de hipersensibilidade observada em interações de resistência. O caso mais estudado é o de tomateiro infectado por *M. incognita* (Williamson, 1998). Em plantas resistentes não há formação dos sítios de infecção após os J2 atingirem a região do tecido vascular, desenvolvendo-se necrose próximo à região proximal do nematóide, que ou morre, ou

abandona a raiz. O curioso neste caso é que a reação de hipersensibilidade apenas se desenvolve no local onde será formado o sítio de alimentação e não durante a migração do nematóide pela raiz, e isto ocorre aproximadamente 12 horas após a penetração, período que coincide com o maior aumento de atividade da enzima fenilalanina amônia-liase. Não é conhecida se a reação de hipersensibilidade é a causa ou um efeito secundário da resistência.

Outro caso de hipersensibilidade estudado é o de *Heterodera glycines* em *A. thaliana*, que normalmente não é hospedeira deste nematóide, porém algumas vezes pode haver formação de sítios de alimentação (Grundler *et al.*, 1997). Observou-se nestas ocasiões intenso desenvolvimento de coloração marrom ao longo do caminho de migração, assim como necrose na formação do sincício.

1.3. *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*

Muitos nematóides apresentam importância econômica, mas os dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera* são os que mais prejuízos trazem à agricultura.

O gênero *Meloidogyne* foi relatado pela primeira vez no Brasil por Goeldi em 1887, que descreveu *Meloidogyne exigua* parasitando o sistema radicular de cafeeiros. Este gênero também é conhecido como nematóide de galhas e compreende várias espécies (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. exigua*, *Meloidogyne hapla*, entre outras) que atacam diversas culturas de grande importância econômica, como é o caso do cafeeiro e da soja (Ferraz *et al.*, 2001). Mas é na cultura de soja que esse parasita provoca as maiores perdas, pois são poucas as variedades resistentes aos nematóides de galhas, em especial a *M. javanica* (Silva *et al.*, 2001). De rápida reprodução (assexuada), produz cerca de 400 ovos em quatro a seis semanas, e de cada ovo, novas larvas estão prontas para infectar novas plantas e recomeçar o ciclo. Sua disseminação se dá principalmente pelo deslocamento da terra contaminada de uma região para outra. A

principal forma de controle deste nematóide é a rotação de culturas e o cultivo de espécies resistentes.

O gênero *Heterodera* é o segundo grupo de nematóides em importância econômica, ficando logo após o gênero *Meloidogyne*, e tem a soja como a cultura com as maiores perdas provocadas por *H. glycines*. Este nematóide é vulgarmente conhecido como o nematóide de cisto da soja (NCS), devido à sua forma de reprodução, na qual diferente dos outros nematóides, os ovos ficam armazenados no interior do abdômen da fêmea, e este, se torna rígido e resistente após sua morte, formando uma parede protetora para os ovos. Encontrado pela primeira vez no Brasil em 1991 (Silva, 1999; Bonato *et al.*, 2002) em plantações de soja, disseminou-se rapidamente pelas principais regiões produtoras do país, provocando grandes quedas de produtividade nesta cultura (Silva, 1999). Assim como o gênero *Meloidogyne*, sua disseminação se dá principalmente pelo deslocamento de solo, contaminado com os cistos, para outras regiões. Detectado inicialmente na região do cerrado, disseminou-se rapidamente por diversas regiões produtoras de soja no país (Silva, 1999; Bonato *et al.*, 2002).

1.4. PPO e a resistência de plantas a nematóides

O envolvimento de PPO na reação de hipersensibilidade foi proposto por alguns autores no ataque de plantas por bactérias (Barna *et al.*, 1972; Van Lelyveld, 1975a,b; Lelyveld *et al.*, 1975; Conti *et al.*, 1982) e nematóides (revisado em Zacheo *et al.*, 1997).

Há muito se sugere que PPO e seus substratos, os compostos fenólicos, estão envolvidos na resistência de plantas a nematóides (Giebel, 1982; Plowright *et al.*, 1996). No entanto, não é conhecido nenhum estudo em que a atividade de PPO tenha sido acompanhada desde os estádios iniciais de infecção (intervalo de horas) e, muito menos, que estudos moleculares tenham sido conduzidos neste sentido. Portanto, as respostas aos danos celulares

durante a penetração não são conhecidas e uma avaliação tardia não oferece informação precisa, pois várias reações observadas em plantas resistentes também são observadas em suscetíveis, porém, diferindo no tempo, ou seja, são mais rápidas nos hospedeiros resistentes (Lamb *et al.*, 1992). No caso de interações incompatíveis, PPO poderia ter atividade constitutiva maior, por expressão diferencial de genes de uma mesma família de genes, ou ainda produção de mRNA específico por células vizinhas ao local de infecção, como observado para dano mecânico em maçã (Boss *et al.*, 1995) e tomateiro (Thipyapong *et al.*, 1995). Para algumas plantas tem sido observada produção de mRNA de PPO apenas 8 h após o dano mecânico.

Ganguly & Dasgupta (1984) observaram maior aumento de PPO em tomateiro resistente inoculado com *M. incognita* por meio de alterações no padrão eletroforético de isoenzimas. A validade de tais resultados é duvidosa, pois podem refletir apenas uma variação devido à complexação da enzima com quinonas ou sua proteólise durante a extração, uma vez que a primeira avaliação somente foi feita após 3 dias da inoculação.

Aumento de PPO também foi observado em cenoura infectada com *M. hapla* após 60 e 90 dias da inoculação (Sivakumar & Vadivelu, 1995).

Atividade constitutiva maior de PPO foi observada em variedades de batata resistentes a *G. pallida* (Amalraj, 1995). Em adição, plantas resistentes inoculadas ou com as raízes danificadas mecanicamente também apresentaram atividade de PPO maior do que na variedade suscetível.

Seguindo a evolução da infecção de cafeeiros por graus-dias, Mazzafera *et al.* (1989) observaram que houve aumento de PPO em plantas infectadas da espécie resistente (*Coffea canephora* cv. Apoatã) em comparação com não infectadas. Este aumento ocorreu no estágio em que seria correspondente à fase de penetração de larvas, não sendo isto observado na fase

de fêmea adulta. Também se observou que a atividade de PPO era constitutivamente maior em Apatã do que na espécie suscetível (*Coffea arabica* cv. Mundo Novo).

Recentemente, estabeleceu-se relação positiva entre a resistência de *Prunus domestica* ao nematóide anelado (*Mesocriconema xenoplax*) com alta atividade constitutiva de PPO (Carneiro *et al.*, 1998).

Não se conhece nenhum trabalho que relacione a PPO em soja como forma de defesa a nematóides. No entanto, Constabel & Ryan (1998), verificando a indução da enzima por dano mecânico ou metiljasmonato em várias espécies, observaram que não ocorria aumento da enzima em folhas de soja, mas que, entre as plantas estudadas, nela o nível de atividade era um dos mais altos. Os autores levantaram a possibilidade de que a resposta a metiljasmonato possa ser específica ao tecido, como observado para outras plantas (Steffens *et al.*, 1994). Com base no trabalho de Felton *et al.* (1993), que observaram que dependendo do tipo de inseto, ocorria ou não aumento de atividade de PPO em folhas de soja, Constabel & Ryan (1998) também levantaram a possibilidade da influência do tipo de dano. Felton *et al.* (1993) verificaram que a infestação de afídeos induzia PPO, mas a de besouro herbívoro não.

2. OBJETIVO

Sabendo-se que larvas J2 dos nematóides *H. glycines* e *M. javanica* migram nas raízes de maneira diferente (respectivamente, uma destruindo as células com o estilete e a outra por entre as células, sem ocasionar danos), o objetivo deste estudo foi verificar se a enzima polifenoloxidase possui algum papel na resistência de duas variedades de soja, uma resistente (Hartwig) e outra suscetível (Cristalina), a ambos nematóides. Portanto, este estudo investiga os momentos iniciais do processo de infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e nematóides

As sementes de soja das variedades Cristalina (suscetível) e Hartwig (resistente) utilizadas nos ensaios foram obtidas com o nematologista Dr. João Flávio Veloso Silva, do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR), e os inóculos iniciais dos nematóides *M. javanica* e *H. glycines* raça 3 foram fornecidos pelo nematologista Dr. Cláudio Marcelo G. de Oliveira, Pesquisador Científico do Instituto Biológico – Estação Experimental de Campinas. A manutenção dos inóculos de nematóide foi feita inoculando-se ovos de *M. javanica* em tomateiros da variedade Ruttgers e *H. glycines* em plantas de soja da variedade Cristalina. Para obtenção de inóculos, os ovos dos nematóides foram extraídos destas plantas por centrifugação com solução de sacarose e caolim (Coolen & D’Herde, 1972) e colocados para eclodir em um funil de Baermann modificado para recipiente raso (Baermann, 1917), para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) usados nos ensaios. Os ovos de *H. glycines* foram colocados para eclodir com solução de sulfato de zinco 0,01 M (Acedo & Dropkin, 1982; Bostian *et al.*, 1984). A contagem estimada de larvas J2 em 1 mL foi feita em lâmina de Peters e a quantidade desejada de larvas foi ajustada para um volume final de 10 mL pela adição de água destilada.

3.2. Medidas de atividade de PPO

3.2.1. Extração e tampão de reação

Nesta etapa padronizou-se o procedimento de extração e determinação da atividade de PPO em raiz de soja. Sementes da variedade Cristalina foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos, lavadas, embebidas com água destilada e colocadas para germinar em bandeja com vermiculita autoclavada (120°C, 1 bar, 30 min). Após uma

semana foram coletadas as raízes das plântulas, lavadas e acondicionadas em isopor com gelo, antes de serem extraídas em almofariz (previamente gelado a 4°C) com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (4°C), com a adição de polivinilpolipirrolidona (PVPP) durante a maceração (1:10 p/p). O tampão foi preparado com e sem 0,1% de triton X-100, para se testar a eficiência deste detergente orgânico na extração de PPO. Em seguida à maceração, o extrato foi centrifugado a 27.000 g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e utilizado nos ensaios enzimáticos. As proteínas totais do extrato foram quantificadas com reagente pronto da Pharmacia (Bradford, 1976).

A atividade da PPO foi determinada acompanhando-se, em espectrofotômetro ($\lambda = 420$ nm), a variação de absorbância por um período de 3 min, com intervalos de 15 seg. O meio de reação era composto por tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 (25°C), contendo ou não 0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS), para testar sua capacidade de ativação da enzima e o substrato 4 metilcatecol (4MC), na concentração final de 2 mM.

3.2.2. Testes de substratos e atividade na raiz

Inicialmente foram feitos testes com apenas quatro substratos [4MC, ácido clorogênico (ácido cafeoil-5-quinico - CGA), catecol, Dopa], utilizando-se extratos de raiz de soja. Posteriormente, outros substratos foram testados (ácido caféico, ácido protocatecólico, tirosina, ácido cumárico, siringaldazina, dopamina, ácido ferúlico, ácido ascórbico e *p*-fenilenodiamino) em meio de reação contendo 0,1% de SDS. A atividade da PPO nas raízes secundárias também foi analisada comparativamente ao sistema radicular inteiro.

3.3. Avaliação do dano mecânico, do metiljasmonato e da infecção de nematóides na atividade da PPO de raiz de soja.

3.3.1. Dano Mecânico

Sementes de soja Cristalina e Hartwig foram colocadas para germinar, como descrito no item 3.2.1., e com o surgimento do primeiro par de folhas verdadeiras (7 dias após embebição) foram transferidas para bandejas plásticas com o fundo forrado com papel de filtro umedecido com água destilada e Nistatin (fungicida). Na transferência, as plântulas tiveram suas raízes lavadas cuidadosamente em água corrente e depois metade das raízes foi machucada ao longo de sua extensão, fazendo-se uma leve pressão com uma pinça (Constabel & Ryan, 1998). Os caules das plântulas ficaram encostados na parede das bandejas de forma que as raízes ficassem estendidas sobre o papel de filtro. Sobre elas foi colocado papel de filtro umedecido em água e Nistatin, e sobre o papel de filtro, uma camada de papel alumínio para evitar o ressecamento e o contato com a luz. As raízes foram coletadas com 6, 12, 24, 48 e 72 h após o dano e avaliadas para PPO, como descrito no item 3.2.1., usando o CGA como substrato na reação enzimática.

3.3.2. Metiljasmonato

Sementes de soja Cristalina e Hartwig foram colocadas para germinar (item 3.2.1.) e transferidas após 5 dias da embebição, duas a duas, para tubetes de 120 mL contendo uma mistura de terra e areia (1:1, v/v). Os tubetes e a mistura terra/areia foram previamente esterilizados em autoclave (120°C, 1 bar, 2 h). As plântulas nos tubetes foram regadas com 100 mL de solução de 0 (controle), 100 e 400 µM de metiljasmonato de uma só vez, logo após a abertura do primeiro par de folhas verdadeiras (plântulas com 2 dias após a transferência). Suas raízes foram coletadas (lavadas, pesadas, identificadas e mantidas no gelo) para análise de atividade da PPO após 6, 12, 24, 48 e 72 h da aplicação do metiljasmonato. Cada coleta foi composta de 4 repetições de 4 tubetes por tratamento. Diferente do experimento anterior, a

atividade da enzima foi analisada pelo consumo de O₂ na reação, usando um oxímetro da Hansatech Instruments (Mazzafera & Robinson, 2000).

3.3.3. Nematóides

Foram montados dois ensaios, um para cada espécie de nematóide, nos quais plântulas de soja com o primeiro par de folhas verdadeiras transplantadas para tubetes (ver item 3.3.2.) foram inoculadas com 15.000 larvas J2 por tubete (ajustado para um volume final de 10 mL). As larvas J2 foram inoculadas com uma pipeta, tomando-se o cuidado para distribuir uniformemente o volume ao redor das plântulas. As raízes foram coletadas com 6, 12, 24, e 72 h após a aplicação do inóculo, sendo cada uma delas composta de 5 repetições para dosagem enzimática (coletadas e extraídas como no item 3.2.1.) e 2 para estudos moleculares (ver item 3.4. abaixo), para o que as raízes foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e guardadas a -70°C. Raízes não infectadas foram coletadas para serem usadas como controle. A análise da atividade da PPO foi feita como descrito no item 3.3.2..

3.4. Manipulação de ácidos nucléicos

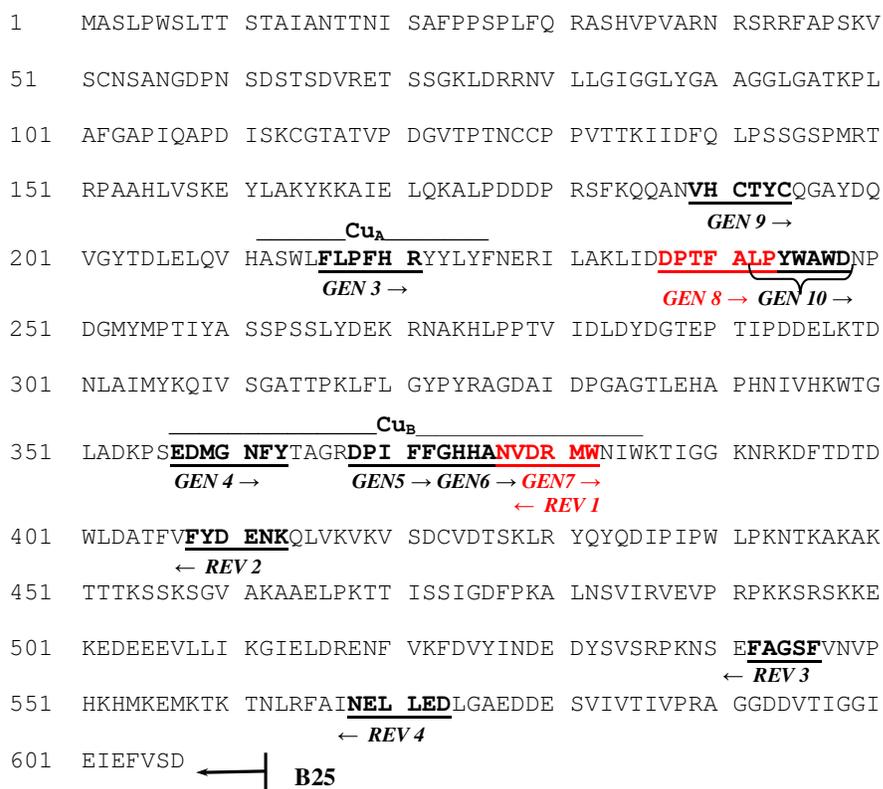
3.4.1. Extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA

Foi feita a extração do RNA total (Dry & Robinson, 1994) das raízes de soja da variedade Hartwig do ensaio descrito no item 3.3.3., após 48 h da aplicação dos juvenis de *M. javanica* e que tinham sido guardadas a -70°C. Escolheu-se esta amostra (48 h) por ser o início do aumento de atividade da PPO (com máximo em 72 h - dados mostrados adiante, em Resultados e Discussão) e, possivelmente, o período de maior expressão da enzima. Foi feita a síntese da primeira fita de cDNA usando-se kit da Boehringer Mannheim – “1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)” e o primer B26 (Frohmann *et al.*, 1988). Verificou-se a

qualidade do RNA após a separação em gel de agarose 1% com brometo de etídio, e visualização sob luz UV em fotodocumentador (Gel Doc 2000, BIO RAD). A quantificação do RNA total foi feita em 260 nm.

3.4.2. Primers, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase

Reações de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram feitas com cDNAs primeira fita e com primers degenerados de PPO, desenhados baseando-se em seqüências conhecidas de PPO de várias plantas (Thygesen *et al.*, 1995). As reações de RT-PCR foram feitas combinando-se primers em sentido “sense” (GEN3, GEN4, GEN5, GEN6, GEN7, GEN8, GEN9 e GEN10) com os primers “antisense” (REV1, REV2, REV3, REV4 e B25). O esquema abaixo mostra a posição relativa dos primers para PPO usados no ensaio em uma seqüência completa de PPO de uva.



Programação do termociclador:

- 2 ciclos de 94°C/2 min; 37°C/2 min; rampa até 72°C em 2 min e manutenção por mais 2 min na mesma temperatura;
- 28 ciclos de 94°C/2 min/56°C por 2 min; 72°C/2 min;
- 72°C/7 min (manutenção);
- manutenção a 4°C.

A verificação da amplificação de fragmentos foi feita após separação em gel de agarose 1%, com brometo de etídio e sob luz ultra violeta (UV).

3.4.3. Clonagem dos fragmentos

Selecionados os fragmentos amplificados (bandas) de interesse, obtidos nas reações de RT-PCR, estes foram extraídos do gel de agarose com kit da Roche (Agarose gel DNA extraction kit), fazendo posteriormente sua inserção em vetor da Promega (pGEM®-T Easy Vector Systems). Os vetores foram clonados em *Escherichia coli* DH5- α por choque térmico, seguido de plaqueamento em meio sólido de cultura LB seletivo, contendo ampicilina, isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-gal) (Sambrook *et al.*, 1989). Confirmadas as inserções por testes rápidos (minipreps), as colônias selecionadas tiveram o vetor purificado (Sambrook *et al.*, 1989). Os fragmentos inseridos no vetor pGEM-T Easy Vector foram seqüenciados nas duas fitas usando os primers T7 e SP6, de regiões que flanqueam o ponto de inserção. Foi feita a comparação das seqüências no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e análise de homologia (ClustalX). Quando confirmadas positivamente para PPO, elas foram utilizadas para a obtenção de sondas para uso em nos experimentos de Southern e Northern blots, conforme descrito em seguida.

3.4.4. Southern blot

DNA foi extraído de folhas de Cristalina e Hartwig (Stewart & Via, 1993) e 5 µg tratados com as enzimas de restrição Dra I ou Eco RI. Os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio, e visualizados em UV para certificação de boa separação. O gel foi então lavado em solução de HCl 0,1 M por 30 min, transferido para solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 30 min e depois para uma solução de neutralização (NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M em pH 8,0) por mais 30 min. A transferência para uma membrana de nylon Hybond-N+ da Pharmacia foi feita por capilaridade, usando-se solução 20x SSC. O DNA foi fixado na membrana por calor, em estufa a 80°C, por 2 h (Moore, 1987).

As sondas foram marcadas com [³²P]dCTP em reação contendo tampão de reação, fragmento Klenow, o DNA clonado (JH1 ou JH2), PdN6, desoxirribonucleotídeos (com exceção de CTP) e [³²P]dCTP em volume final de 20 µL, colocado em banho seco a 37°C por 1 h (Moore, 1987). A membrana foi incubada com solução de pré-hibridização (5x SSC, 5x Denhardt's, 1% SDS e 0,4 µg/mL de DNA desnaturado de salmão) por 2 h a 65°C. Para a hibridização, as sondas marcadas com [³²P]dCTP foram colocadas em forno de hibridização à 65°C com as membranas, imediatamente após a pré-hibridização, e por 16 h. Após este período as membranas foram lavadas duas vezes por 10 min em solução 2x SSPE e SDS 1%, em temperatura ambiente e, por 15 min, com solução 1x SSPE e SDS 1% a 65°C, para limpeza das sondas não ligadas ao DNA (Moore, 1987), antes de serem reveladas no aparelho Cyclone Image Analyser (Packard).

3.4.5. Northern blot

RNA total foi extraído de raiz de soja em diferentes períodos após a inoculação de J2

de *M. javanica* (Hartwig - 6, 12, 24, 48, 72 h) e *H. glycines* (Cristalina e Hartwig, 12, 24 e 48 h). Desses RNAs, 5 µg foram desnaturados em tampão MOPS/EDTA contendo formamida e colocados em gel de agarose 1% com formamida e brometo de etídio (Sambrook, 1989). Logo após a corrida da eletroforese, por capilaridade foi feita a transferência do RNA para uma membrana de nylon Hybond-N+ da Pharmacia com 20x SSC (Sambrook *et al.*, 1989). Após a fixação do RNA em estufa (80°C/2 h), a membrana foi incubada com as sondas marcadas (item 3.4.5) com solução de pré-hibridação (5x SSC, 5x Denhardt's, SDS 0,5%, DNA de salmão desnaturado 0,4 µg/mL e formamida 50%) a 65°C por 2 h, seguida da marcação com a sonda JH1 utilizada no Southern Blot em forno de hibridização a 65°C por 16 h. Após este período, a membrana foi lavada e revelada como no Southern blot.

3.5. Ensaio integrado

Neste ensaio foram definidos vários pontos que de certa maneira os ensaios anteriores deixaram em aberto, principalmente porque os resultados obtidos deram origem a novos questionamentos. Nele, plântulas de soja de 7 dias, germinadas como anteriormente descrito, foram expostas a metiljasmonato 100 µM por 24 h (0 - 24 h em vermelho). Em seguida, foram inoculadas com 20.000 nematóides J2 (24 - 72 h em vermelho). Controles foram inoculados com J2 na mesma hora que as plantas tratadas com metiljasmonato (0 - 48h em azul) foram inoculadas. Porém, devido à restrição na quantidade de inóculo, as avaliações para *H. glycines* foram feitas somente após 48 h da inoculação com J2.

A tabela 1 esquematiza melhor este ensaio, onde foram feitas várias coletas para as seguintes dosagens: 1) Dosagem de fenóis (quantitativos e qualitativos – HPLC) em extratos etanólicos; 2) Dosagem de PPO em extratos protéicos; 3) Análise de expressão usando-se os dois clones JH1 e JH2 por RT-PCR; 4) Determinação do índice de reprodução em plantas

tratadas ou não com metiljasmonato e inoculadas com 500 e 1.000 J2.

Tabela 1. Esquema do experimento em que plântulas de soja foram expostas a metiljasmonato e depois inoculadas ou não com *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*.

Tempos de exposição e inoculação			
-----Metiljasmonato-----//-----inoculação com nematóides-----			
0h -----24h-----48h-----72h-----			
0h-----24h-----48h-----			
Coleta em 0h de não inoculadas	Coleta em 0h plantas não inoculadas	Coleta em 24h plantas não inoculadas	Coleta em 48h plantas não inoculadas
	Coleta em 24h plantas tratadas com metiljasmonato	Coleta em 48h plantas tratadas com metiljasmonato	Coleta em 72h plantas tratadas com metiljasmonato
		Coleta em 24h plantas inoculadas com MJ	Coleta em 48h plantas inoculadas com MJ
			Coleta em 48h plantas inoculadas com HG
		Coleta plantas tratadas com metiljasmonato (48h) e inoculadas com MJ (24h)	Coleta plantas tratadas com metiljasmonato (72h) e inoculadas com MJ (48h)
		Coleta plantas tratadas com metiljasmonato (48h)	Coleta plantas tratadas com metiljasmonato (72h) e inoculadas com HG (48h)

Em vermelho: metiljasmonato foi fornecido entre 0h e 24 h, quando a partir de então, algumas plantas foram inoculadas com nematóides. A partir desse tempo, começou a ser contado o tempo de inoculação com nematóide, em azul. HG = *Heterodera glycines*; MJ = *Meloidogyne javanica*.

Após a retirada das raízes dos tubetes, elas foram pesadas e parte delas destinadas para dosagem de fenóis totais (Swain & Hillis, 1959), após extração com etanol 70% (90°C por 2 h). Os mesmos extratos etanólicos foram analisados em HPLC com uma coluna de fase reversa C₁₈ (Supelco, 4 mm x 250 mm, 5µm diâmetro de partículas). Os compostos eluindo da coluna foram monitorados com detector de diodo operando entre 190 e 370 nm. A separação de fenóis foi feita usando-se um gradiente de 5 a 100% de metanol em ácido acético 0,5% em 40 min. Os picos foram processados com uma estação de trabalho da Shimadzu, utilizando o software Class-VP 6.12 da mesma empresa.

Outra parte das raízes foi reservada para as dosagens de atividade de PPO (ver item

3.3.3) e para extração de RNA para a realização de RT-PCR, após a produção da primeira fita de cDNA (ver itens 3.4.1 e 3.4.2).

Algumas plântulas tratadas e não tratadas com metiljasmonato 100 μ M foram inoculadas com 500 e 1.000 larvas J2, e depois de 10 dias foram transferidas para vasos de 3 L contendo uma mistura de terra e areia (1:1, v/v), onde permaneceram até serem extraídas para contagem dos ovos e larvas J2 de suas raízes (Coolen & D'Herde, 1972), após 35 dias da inoculação, sendo este período estabelecido levando-se em conta que o ciclo de vida destes nematóides é de 30 dias aproximadamente, sendo acrescentados os 5 dias para o estabelecimento do nematóide nas raízes das plantas inoculadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração da PPO e testes de substratos e raízes

Foi testado o emprego de detergentes na extração da PPO de raízes de soja e na atividade dessa enzima. Observou-se que o triton X-100 aumentou a eficiência de extração pela maior atividade em comparação com um extrato feito sem a adição do triton X-100 (figura 1). Quando o SDS foi acrescido à reação enzimática, não foi notada uma mudança significativa na atividade dessa enzima quando comparada ao efeito do triton X-100. Apesar disso, seu uso foi mantido nos ensaios posteriores, pois alguns trabalhos mostram que o SDS potencializa a atividade de algumas PPOs (Steffens *et al.*, 1994; Friedman, 1997, Laveda *et al.*, 2000; Jukanti *et al.*, 2003).

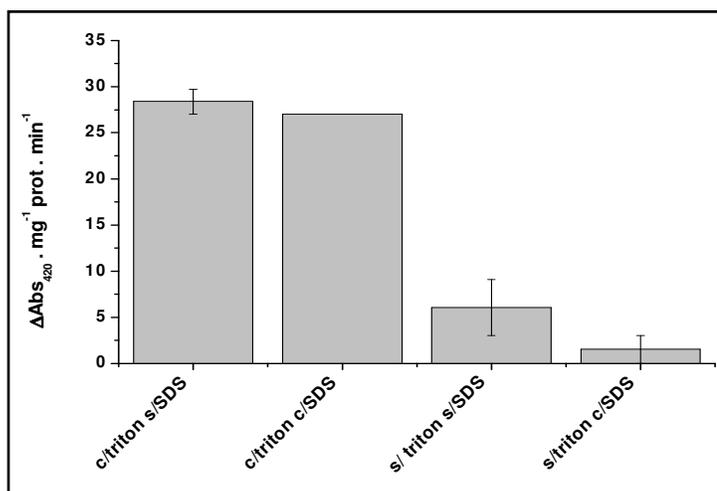


Figura 1. Efeito da adição de triton X-100 no tampão de extração e do SDS no tampão da reação enzimática na atividade da polifenoloxidase (n = 3; barra = SE).

Após a definição do tampão de extração, que passou a conter triton X-100, foram feitos testes com alguns substratos para PPO, utilizando-se inicialmente 4MC, CGA, catecol e dopa. Neste ensaio, PPO de raiz de soja apresentou maior afinidade por CGA, como se observa na figura 2, seguida de 4MC, dopa e catecol respectivamente.

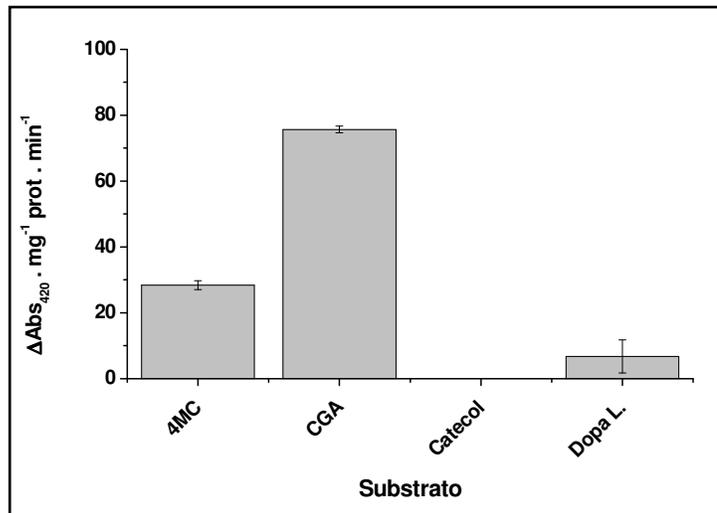


Figura 2. Comparação de atividade da polifenoloxidase em espectrofotômetro com 4 diferentes substratos para esta enzima (n = 3; barra = SE).

Em seguida, foi realizado outro ensaio, no qual vários outros possíveis substratos para a PPO foram testados (Yang *et al.*, 2000, Mazzafera & Robinson, 2000). Como mostra a figura 3, CGA continuou sendo o melhor substrato, seguido de 4MC e syringaldazina, um fenol que é substrato específico para peroxidase extracelular. Os outros substratos não apresentaram atividade mensurável.

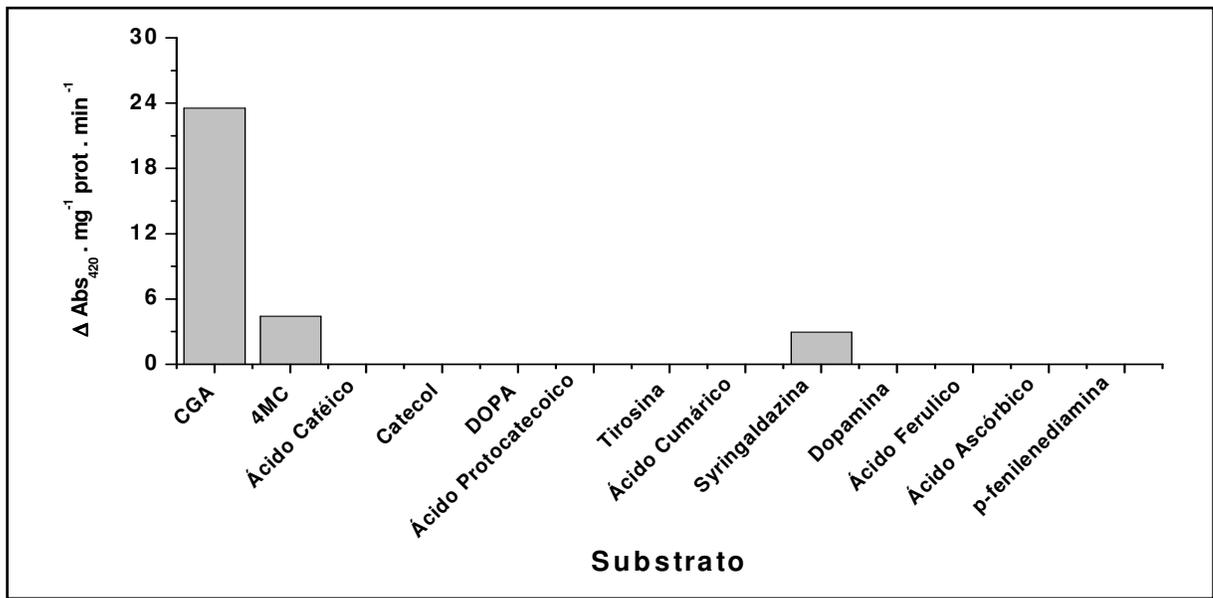


Figura 3. Atividade da polifenoloxidase em teste de afinidade feito com 13 possíveis substratos para esta enzima.

No teste comparativo de atividade de PPO no sistema radicular inteiro e nas raízes secundárias de soja, foi observado que a maior atividade da enzima se concentrava nas raízes secundárias (figura 4), provavelmente por se tratar de um tecido mais novo (Mazzafera & Robinson, 2000). Ainda que raízes secundárias tenham apresentado maior atividade, optou-se por medir PPO no sistema radicular inteiro, pois além de apresentar boa atividade, mostrou maior praticidade durante a coleta.



Figura 4. Atividade da polifenoloxidase analisada em extrato protéico obtido do sistema radicular inteiro e das raízes secundárias em soja.

4.2. PPO e dano mecânico

No ensaio com o dano mecânico a análise da atividade da PPO nas raízes de sojas suscetível e resistente a nematóides não apresentou grande variação entre as variedades Cristalina e Hartwig, machucadas ou não (figura 5). Porém, observou-se uma tendência de maior aumento na atividade de PPO nas raízes da variedade Hartwig machucadas, como mostra a figura 5.

Apesar do aumento da atividade da PPO ter ocorrido em ambos os tratamentos e com as duas variedades de soja, pode-se observar que existiu maior nível de atividade da PPO em raiz machucada de Hartwig, já visível com 48 h após o início do ensaio (figura 5). O aumento de atividade da PPO na raiz das outras plantas, embora em menor nível, provavelmente

ocorreu em resposta à manipulação das raízes durante a montagem do ensaio. É possível que, em parte, o aumento tenha sido em função da colocação das raízes nas bandejas e que possa ter ocorrido certo dessecação. Porém, também pode ter sido em função da intensidade do dano, ainda que isto tenha sido feito com certa padronização.

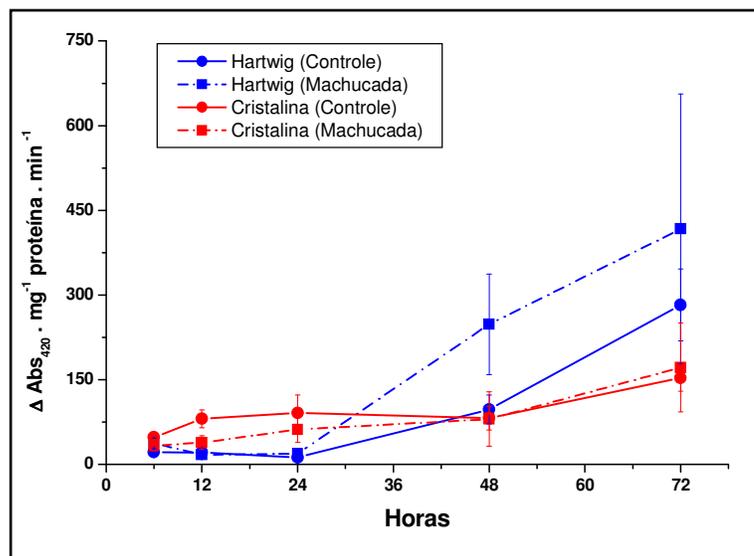


Figura 5. Efeito do dano mecânico em raízes de soja suscetível (Cristalina) e resistente (Hartwig) a nematóides sobre a atividade da polifenoloxidase (n = 5; barra = SE).

Batatas induzidas por dano mecânico apresentaram aumento na atividade de PPO (Thipyapong *et al.*, 1995). No trabalho de Constabel & Ryan (1998) observou-se que folhas machucadas de algumas plantas tiveram aumento de PPO pelo fato de células terem sido rompidas, colocando o substrato (fenóis no vacúolo) em contato com a enzima, situada no cloroplasto. Em contrapartida, estes mesmos autores não observaram maior atividade da PPO nas folhas de soja danificadas por pressão de uma pinça.

O aumento da atividade da PPO tem sido relacionado como uma forma de defesa da planta. No trabalho de Felton *et al.* (1989) mostrou-se que em casos de herbivoria ocorre o aumento da PPO, o que provoca diminuição da qualidade nutricional do tecido e atraso no desenvolvimento da larva de *Spodoptera exigua*. Neste caso, a variedade Hartwig poderia estar

“interpretando” o dano mecânico como se fosse um ataque de uma praga às suas raízes.

4.3. PPO e metiljasmonato

Plântulas de soja das variedades Cristalina e Hartwig tratadas com metiljasmonato apresentaram aumento na atividade da PPO em suas raízes após 24 h do início do ensaio. Esse aumento foi visível mesmo em raízes tratadas com a solução de menor concentração de metiljasmonato (figura 6). Observou-se em Hartwig maior aumento de PPO com 72 h, como mostra a figura 6. Vários trabalhos têm mostrado o aumento de atividade de PPO induzida por metiljasmonato (Constabel & Ryan, 1998; Felton & Korth, 2000; Thaler *et al.*, 2001). A produção de metiljasmonato está relacionada com a enzima lipoxigenase, que atua sobre o ácido linolênico, liberado da membrana por ação de lipases mediante o ataque de patógenos, resultando na produção de metiljasmonato. Este por sua vez atua como molécula sinalizadora, desencadeando reações de defesa da planta ao ataque de insetos e patógenos (Constabel & Ryan, 1998; Felton & Korth, 2000; Thaler *et al.*, 2002).

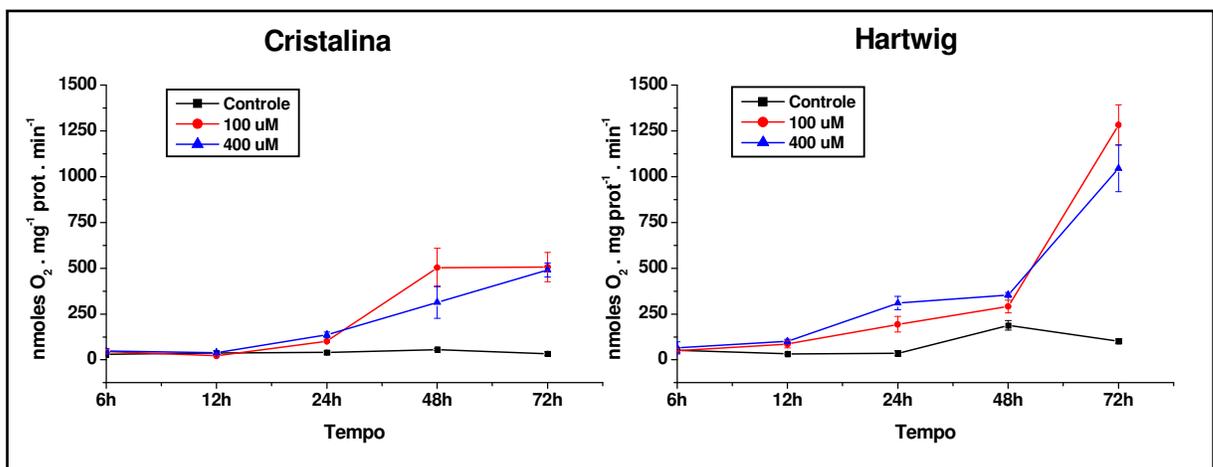


Figura 6. Atividade da polifenoloxidase nas raízes de soja Cristalina (suscetível) e Hartwig (resistente) tratadas com diferentes concentrações de metiljasmonato (n = 4; barra = SE).

No ensaio com dano mecânico (figura 5) a variedade Cristalina não apresentou

aumento de PPO, o que foi observado com a aplicação de metiljasmonato (figura 6). Segundo alguns autores, a resposta ao dano mecânico não necessariamente envolveria os mesmos mecanismos de aumento ou diminuição de expressão de genes que aqueles envolvidos na ativação por metiljasmonato (Felton *et al.*, 1993).

4.4. PPO e inoculação com nematóides

Plântulas de soja foram inoculadas com larvas J2 de *M. javanica* e após 72 h da inoculação observou-se aumento na atividade da PPO nas raízes da variedade Hartwig em comparação com raízes de plantas não infectadas e com raízes de Cristalina, infectada ou não, que por sua vez não apresentaram diferença na atividade da PPO (figura 7).

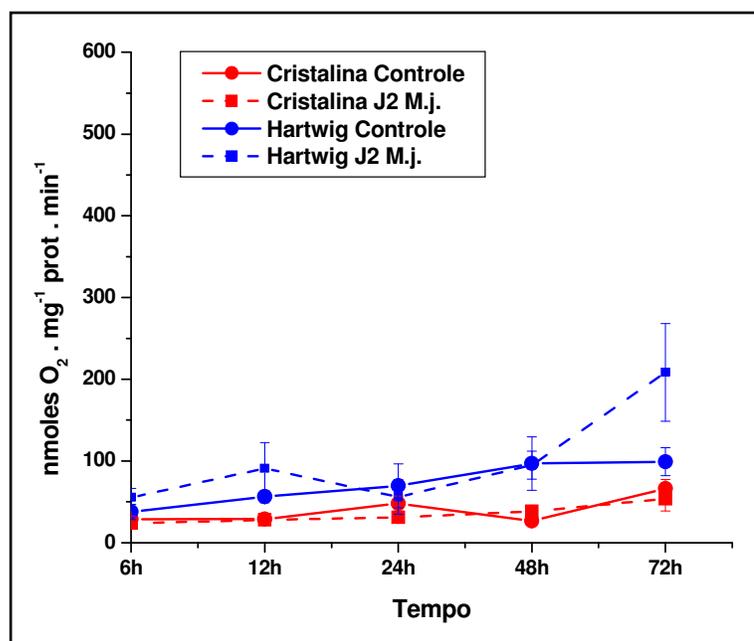


Figura 7. Atividade da polifenoloxidase em raízes de soja suscetível (Cristalina) e resistente (Hartwig) inoculada com larvas J2 de *Meloidogyne javanica* (n = 5; barra = SE).

Vários trabalhos têm relacionado o aumento de atividade da PPO como resposta de defesa a bactérias (Bashan *et al.*, 1987) e herbivoria (Felton *et al.*, 1989; Felton & Korth, 2000; Thaler *et al.*, 2001). Com relação a nematóides, Plowright *et al.* (1996) observaram que 2 a 5

dias após a infecção por *Ditylenchus angustus*, plantas de arroz apresentavam regiões necrosadas na raiz e aumento de compostos fenólicos nas variedades resistentes. Em nosso caso, não foram observadas necroses e nem alterações na raiz, provavelmente pelo curto espaço de tempo do ensaio.

No caso da soja inoculada com J2 de *H. glycines*, houve aumento na atividade de PPO em Hartwig já com 48 h da inoculação (figura 8). Atividade maior foi detectada com este nematóide provavelmente pela forma de infecção e estabelecimento na raiz, uma vez que *H. glycines* provoca mais lesões no tecido da raiz que *M. javanica*. No primeiro caso, o nematóide migra rompendo as células até o local onde irá formar o sincício, enquanto que *M. javanica* migra pelo espaço entre as células até o local onde irá formar o sítio de alimentação, produzindo as células gigantes. Também houve aumento na atividade de PPO em raízes da variedade Cristalina em relação aos controles, mas em escala bem inferior à apresentada por raízes de plantas da variedade Hartwig.

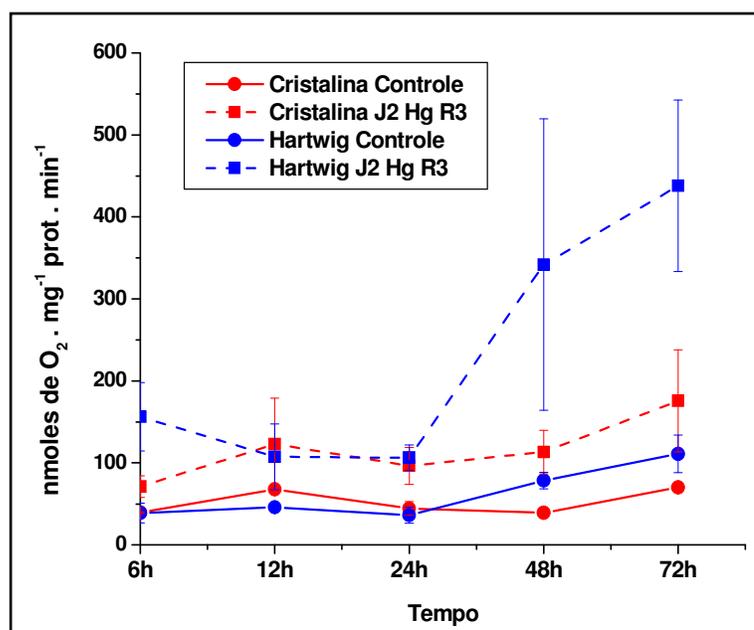


Figura 8: Atividade da polifenoloxidase nas raízes de soja da variedade Cristalina (suscetível) e Hartwig (resistente) inoculadas com larvas J2 de *Heterodera glycines* (n = 5; barra = SE).

4.5. Manipulação de ácidos nucléicos

Foram obtidas várias amplificações RT-PCR a partir dos cDNAs obtidos da variedade Hartwig após 48 h da inoculação com J2 de *M. javanica*, com as várias combinações de primers degenerados para PPO (figura 9). A adoção desse tempo para as análises de expressão gênica se justifica porque foi nele que começou a se observar aumento de PPO em plântulas de Hartwig inoculadas com os dois nematóides (figuras 7 e 8). A extração de RNA total foi feita somente em material inoculado com *M. javanica*, pelo fato de ser o único inoculo disponível na época. Alguns fragmentos das amplificações foram selecionados em função do número de pares de bases esperado, tendo como referência a seqüência de PPOs de outras plantas.

Dos vários fragmentos seqüenciados, 5 foram identificados como sendo PPO, através da comparação com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI. As similaridades com genes de PPOs de outros vegetais são mostradas na tabela 2. Porém, somente dois destes fragmentos (JH1 e JH2) foram completamente seqüenciados, uma vez que as seqüências JH3, JH4 apresentaram grande semelhança com JH2. O sequenciamento de JH5 apresentou muitos nucleotídeos indefinidos, mas também com seqüência parecida com JH2, sendo por este motivo descartado. Os fragmentos JH1 e JH2 apresentaram uma similaridade de 52,8% no alinhamento de nucleotídeos (figura 10) e 40,8% no alinhamento da seqüência de aminoácidos (figura 11), sendo ambos comparados no programa Align para alinhamento e comparação de seqüências (Pearson *et al.*, 1997).

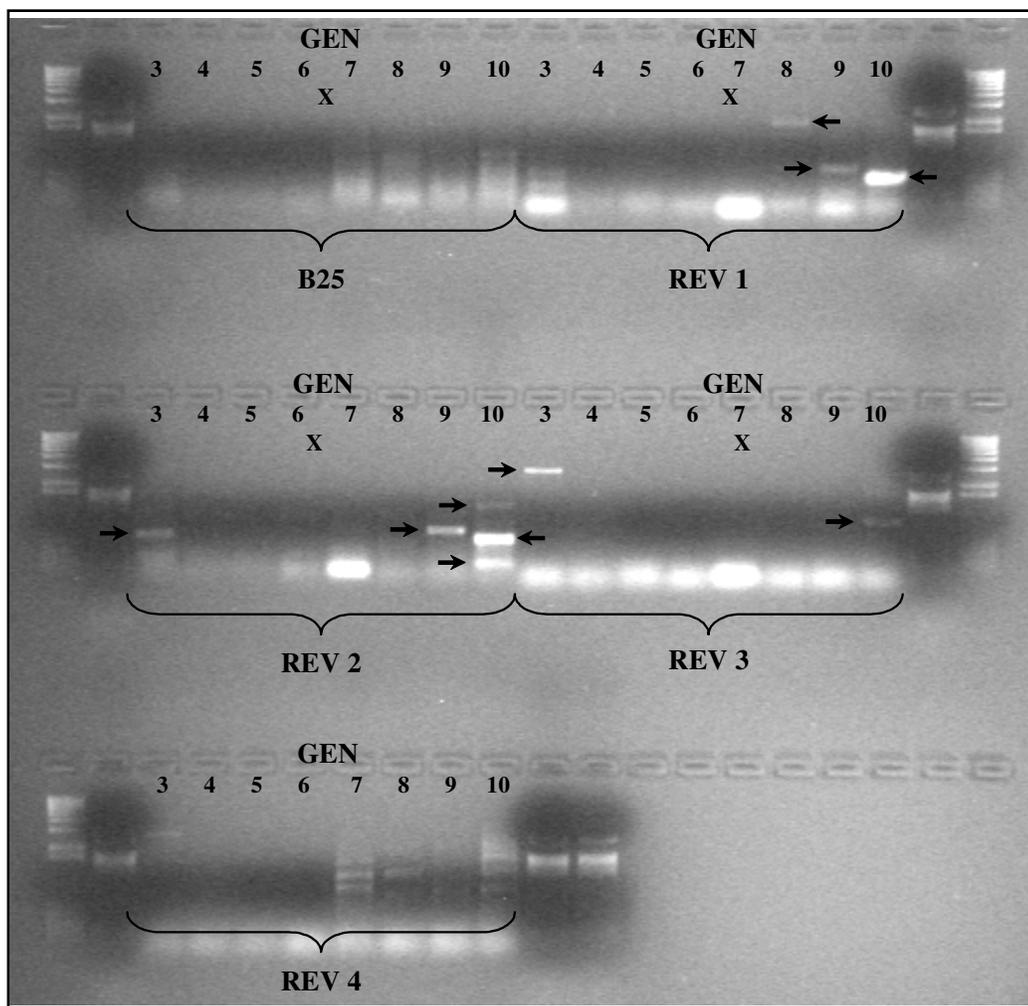


Figura 9: RT-PCR de cDNA de soja com as várias combinações possíveis de primers degenerados para polifenoloxidase. Os fragmentos indicados com uma seta foram selecionados para seqüenciamento.

Tabela 2. Similaridade dos fragmentos identificados como sendo de genes de PPO com seqüências de outras espécies vegetais. A porcentagem de similaridade se encontra entre parênteses na frente do nome de cada espécie.

Seqüência	Primers	SIMILARIDADE		
		Planta I	Planta II	Planta III
PPOJH1	GEN9xREV1	<i>Vicia faba</i> (68%)	<i>Prunus armeniaca</i> (75%)	<i>Ananas comosus</i> (59%)
PPOJH2	GEN9xREV2	<i>Ipomoea batatas</i> (72%)	<i>Vicia faba</i> (76%)	<i>Diospyros kaki</i> (60%)
PPOJH3	GEN9xREV2	<i>Pyrus communis</i> (77%)	<i>Eriobotrya japonica</i> (74%)	<i>Pyrus pyrifolia</i> (74%)
PPOJH4	GEN9xREV2	<i>Pyrus communis</i> (75%)	<i>Eriobotrya japonica</i> (74%)	<i>Pseudocyonia sinensis</i> (73%)
PPOJH5	GEN3xREV3	<i>Ipomoea batatas</i> (82%)	<i>Malus x domestica</i> (78%)	<i>Ananas comosus</i> (78%)

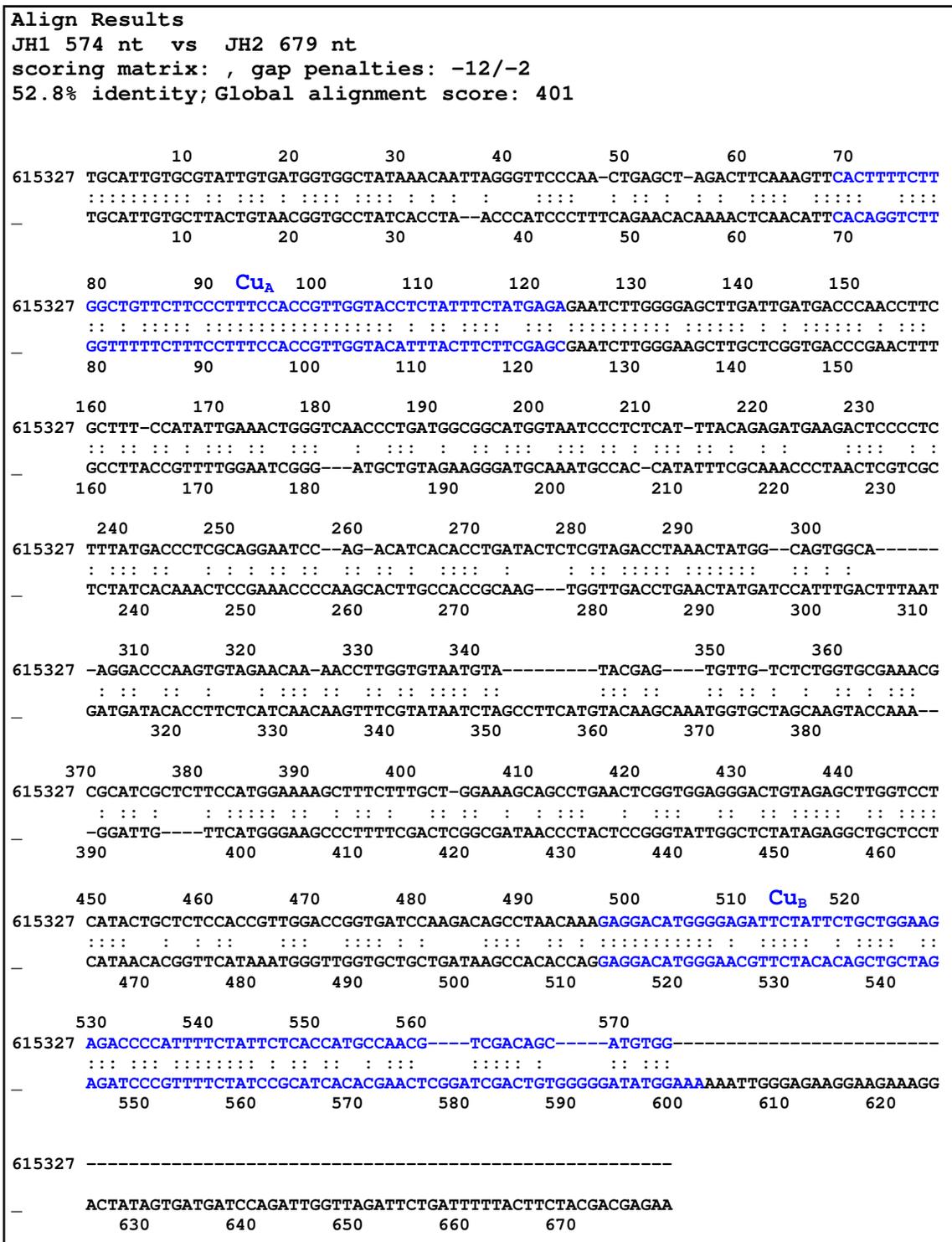


Figura 10: Alinhamento de nucleotídeos dos fragmentos JH1 e JH2 feito pelo Align. Destaque em azul para os sítios de cobre, regiões características da polifenoloxidase.

Hartwig, e em seguida digeridos com as enzimas de restrição Dra I e Eco RI. Esses materiais foram separados em géis de agarose 1% e transferidos para membrana de nylon Hybond+. Após a fixação por calor, foram feitas as hibridizações com as sondas radioativas produzidas com os fragmentos JH1 e JH2 e depois reveladas no aparelho Cyclone Image Analyser, como mostra a figura 12.

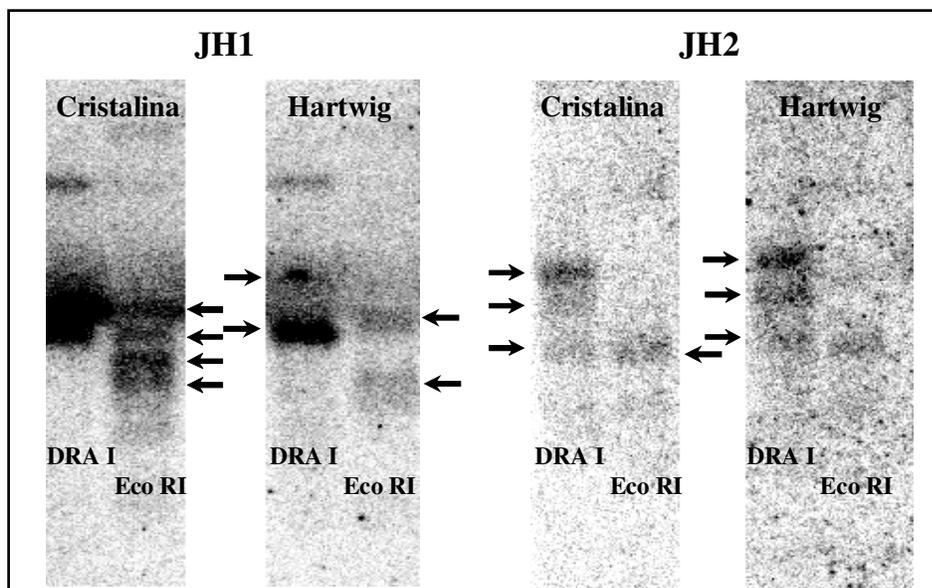


Figura 12: Southern blot marcado com as sondas fabricadas com os fragmentos JH1 e JH2. A marcação da membrana indica o possível número de genes codificando para polifenoloxidase, indicando neste caso até 4 genes pela sonda JH1 e 3 com a sonda JH2.

A marcação feita com a sonda JH1 foi mais eficiente que JH2. Com estes dados, pode-se dizer que JH1 identificou até 4 genes codificando para PPO em Cristalina e pelo menos 2 em Hartwig. Com a sonda de JH2 foram identificados 3 genes para as duas variedades de soja. A presença de uma banda localizada no alto das corridas da membrana hibridizada com a sonda JH1 provavelmente se deve a DNA não cortado pela enzima de restrição. Portanto, uma vez que não existe nenhum sítio de corte para as enzimas Dra I e Eco RI, conforme mostra o mapa de restrição dos fragmentos (figuras 13a e 13b), pode-se concluir que em soja PPO é codificada por uma família multigênica.

A

```

1                                     AluI ag|ct52
1 H C A Y C D G G Y K Q L G F P T E L D F
1 CATTGTGCGTATGTGATGGTGGCTATAAACAAATTAGGGTCCCAACTGAGCTAGACTTC
61                                     KpnI ggtac|c106
61                                     MboII n|nnnnnnntcttc76      RsaI gt|ac104
21 K V H F S W L F F P F H R W Y L Y F Y E
61 AAAGTTCACCTTTCTTGGCTGTCTTCCCTTTCCACCGTTGGTACCTCTATTTCTATGAG
121 AluI ag|ct135
121 HinfI g|antc123      MboII n|nnnnnnntcttc152
41 R I L G S L I D D P T F A L P Y W N W V
121 AGAATCTTGGGGAGCTTGATTGATGACCCAACCTTCGCTCTTCCATATTGGAAGCTGGGTC
181                                     MboII gaagannnnnnn|236
181 HincII gty|rac181      HinfI g|antc227
61 N P D G G M V I P L I Y R D E D S P L Y
181 AACCTGATGGCGCATGGTAATCCCTCTCATTACAGAGATGAAGACTCCCTCTTTAT
241 HinfI g|antc253
81 D P R R N P D I T P D T L V D L N Y G S
241 GACCTCGCAGGAATCCAGACATCACACCTGATACCTCTCGTAGACCTAAACTATGGCAGT
101 G K D P S V E Q N L G V M Y T S V V S G
301 GGCAAGGACCCAAGTGTAGAACAAAACCTTGGTGTAAATGTATACGAGTGTGTCTCTGGT
361 AluI ag|ct392
361 .HindIII.a|agctt390
361 NcoI c|catgg382
361 MboII n|nnnnnnntcttc370
121 A K R A S L F H G K A F F A G K Q P E L
361 GCGAAACGCGCATCGCTCTTCCATGGAAAAGCTTTCTTTGTGGAAGCAGCCTGAAGT
421 NdeII |gatc475
421 MboI |gatc475
421 MspI c|cgg471
421 AluI ag|ct439      HpaII c|cgg471
141 G G G T V E L G P H T A L H R W T G D P
421 GGTGGAGGACTGTAGAGCTTGGTCTCCTACTGCTCTCCACCGTTGGACCGTGATCCA
481 HinfI g|antc510      MboII
gaagannnnnnn|537
161 R Q P N K E D M G R F Y S A G R D P I F
481 AGACAGCCTAACAAAGAGGACATGGGGAGATTCTATTTCTGTGGAAGAGACCCCATTTTC
541 HincII gty|rac562
541 TaqI t|cga561
541 SalI g|tcgac560
181 Y S H H A N V D S M W

```

B

```

1 H C A Y C N G A Y H L T H P F Q N T K L
1 CATTGTGCTTACTGTAACGGTGCCATCACCTAACCCATCCCTTTTCAGAACACAAAACTC
61                                     TaqI t|cga117
61                                     MboII n|nnnnnnntcttc106
61                                     RsaI gt|ac104
21 N I H R S W F F F P F H R W Y I Y F F E
61 AACATTACAGGCTTGGTTTTCTTTCTTTCCACCGTTGGTACATTTACTTCTTCGAG
121 AluI ag|ct135
121 .HindIII.a|agctt133
121 HinfI g|antc123      HinfI g|antc172
41 R I L G S L L G D P N F A L P F W N R D
121 CGAATCTTGGGAAGCTTGCCTCGGTGACCCGAACCTTTCGCTTACCCTTTTGAATCGGGAT
61 A V E G M Q M P P Y F A N P N S S L Y H
181 GCTGTAGAAGGATGCAAAATGCCACCATATTTTCGCAAACCTAATCGTCTGCTATCAC
241 NdeII |gatc292
241 MboI |gatc292
241 HincII gty|rac280
81 K L R N P K H L P P Q V V D L N Y D P F
241 AAATCCGAAACCCCAAGCATTGCCACCGCAAGTGGTTGACCTGAACATGATCCATTT
301 RsaI gt|ac359
101 D F N D D T P S H Q Q V S Y N L A F M Y
301 GACTTTAATGATGATACACCTTCTCATCAACAAGTTTCGTATAATCTAGCCTTCATGTAC
361 RsaI gt|ac382      HinfI g|antc414
361 NheI g|ctagc373      TaqI t|cga412
121 K Q M V L A S T K G L F M G S P F R L G
361 AAGCAAATGGTGTAGCAAGTACCAAGGATTGTTCATGGGAAGCCCTTTTCGACTCGCG
421 MspI c|cgg434
421 HpaII c|cgg434
141 D N P T P G I G S I E A A P H N T V H K
421 GATAACCTACTCCGGTATTGGCTCTATAGAGGCTGCTCCTCATAACACGGTTCATAAA
481 PvuII cag|ctg536
481 AluI ag|ct536
161 W V G A A D K P H Q E D M G T F Y T A A
481 TGGGTTGGTGTCTGATAAGCCACACCAGGAGGACATGGGAACGTTCTACACAGCTGTCT
541 TaqI t|cga580
541 NdeII |gatc544      NdeII |gatc577
541 MboI |gatc544      MboI |gatc577
181 R D P V F Y P H H T N S D R L W G I W K
541 AGAGATCCCGTTTTCTATCCGCATCACACGAACTCGGATCGACTGTGGGGGATATGGAAA
601 NdeII |gatc634
601 MboI |gatc634      HinfI g|antc650
601 MboII gaagannnnnnn|627
201 K L G E G R K D Y S D D P D W L D S D F
601 AAATTGGGAGAGGAAGAAAGGACTATAGTGTATGCCAGATTGGTTAGATTCTGATTTT
221 Y F Y D E
661 TACTTCTACACGAGAA

```

Figura 13: Mapa de restrição dos fragmentos JH1 (A) e JH2 (B) de polifenoloxidase, com destaque em ambos para o sítio de corte da enzima de restrição Hind III.

A síntese da PPO é influenciada por diversos fatores ambientais, onde diferentes genes de PPO são ativados em resposta à herbivoria ou um fator abiótico (Hätteschwiler & Vitousek, 2000). Thipyapong *et al.* (1997) demonstraram que a PPO de tomateiro é codificada por sete genes altamente conservados expressos independentemente. Em batatas, Thygesen *et al.* (1995) isolaram cinco clones bastante conservados a partir de RNA do tubérculo que apresentavam diferenças na sua expressão, onde o clone POT32, por exemplo, era o que mais se expressava em todas as partes do tubérculo. Já o POT33 expressava-se muito mais nas regiões próximas à casca do tubérculo. Esta variação de expressão, em tempo e local, faz com que todos que trabalham com PPO se perguntem para que serve esta enzima em plantas.

4.7. Northern Blot

Foram feitas extrações de RNA total das raízes de soja Cristalina e Hartwig dos tratamentos com metiljasmonato, *M. javanica* e *H. glycines*. Esses RNAs foram separados em géis de agarose 1,2% com formaldeído e depois transferidos para membranas de nylon Hybond+ e hibridizados com as mesmas sondas usadas para o Southern blot. Entretanto, não houve marcação nas membranas com nenhuma das sondas. Provavelmente isto ocorreu pela pequena expressão da PPO nas raízes de soja e uma quantidade mínima de mRNA específico nas amostras. Comparando os dados de atividade de raiz de soja do presente trabalho com aqueles de folhas de soja, feitos por Constabel & Ryan (1998), pode-se verificar que a atividade em tecidos clorofilados é muito maior do que os obtidos em raiz de soja. O mesmo foi observado em cafeeiro (Mazzafera, dados não publicados). Logo, isto indicaria pequena expressão de PPO nas raízes.

Com isto, outra forma de se avaliar a expressão desta enzima foi por RT-PCR. Para tal, é feita a síntese da primeira fita de cDNA partindo de quantidades iguais de RNA, que é então

usada em reações com primers específicos, desenhados a partir das seqüências JH1 e JH2. Estes dados são apresentados mais adiante, juntamente com os dados do ensaio integrado.

4.8. Ensaio integrado

Este ensaio foi realizado a fim de se obter informações integrando os efeitos da exposição ao metiljasmonato e da infecção por nematóides à atividade e expressão de PPO em raízes de soja. Para *M. javanica* foram feitas análises em todas as coletas indicadas na tabela 1, apresentada em Material e Métodos.

4.8.1. Fenóis em raízes de soja tratadas com metiljasmonato e inoculadas com nematóides

Foi feita a análise quantitativa de fenóis totais com reagente de Folin Ciocalteau (Swais & Hillis, 1959) nas raízes de soja da variedade Cristalina e Hartwig, mas estes não apresentaram diferenças entre as plantas controle e as tratadas com metiljasmonato, inoculadas ou não com larvas J2 de *M. javanica* (figura 14).

Diferente do ensaio com *M. javanica*, as raízes das plantas de soja tratadas com metiljasmonato e infectadas com *H. glycines* apresentaram redução de fenóis totais nas raízes da variedade suscetível (Cristalina) inoculada com as larvas J2 do nematóide (figura 15). Para fins comparativos, o mesmo tratamento (inoculação com nematóide) no tempo de 48 h em Hartwig inoculada com *M. javanica* (figura 14), não ocorreu esta redução. Pelo contrário, apresentou aumento de fenóis, indicando ser uma resposta específica à interação variedade x nematóide.

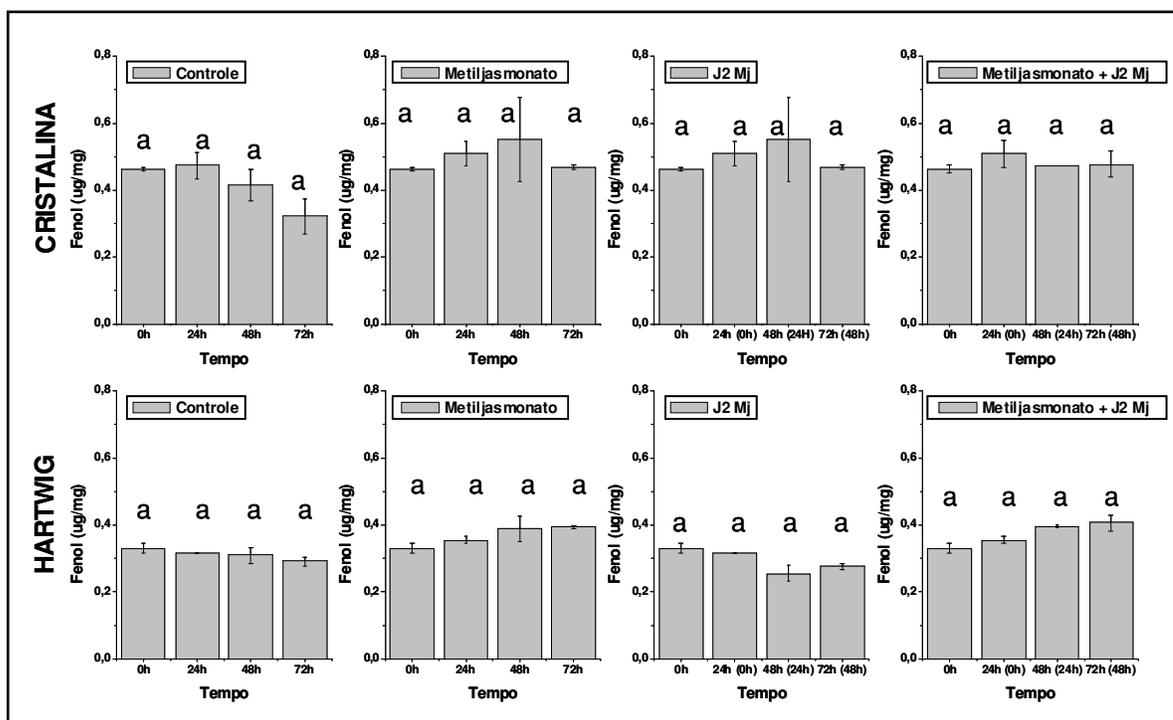


Figura 14: Fenóis totais em raízes de plântulas de soja tratadas ou não com metiljasmonato e, inoculadas ou não com larvas J2 de *Meloidogyne javanica*. Os tempos entre parênteses correspondem ao período de inoculação do nematóide após a exposição ao metiljasmonato. Mj = *Meloidogyne javanica*. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos nas duas variedades de soja (n = 3; barra = SE).

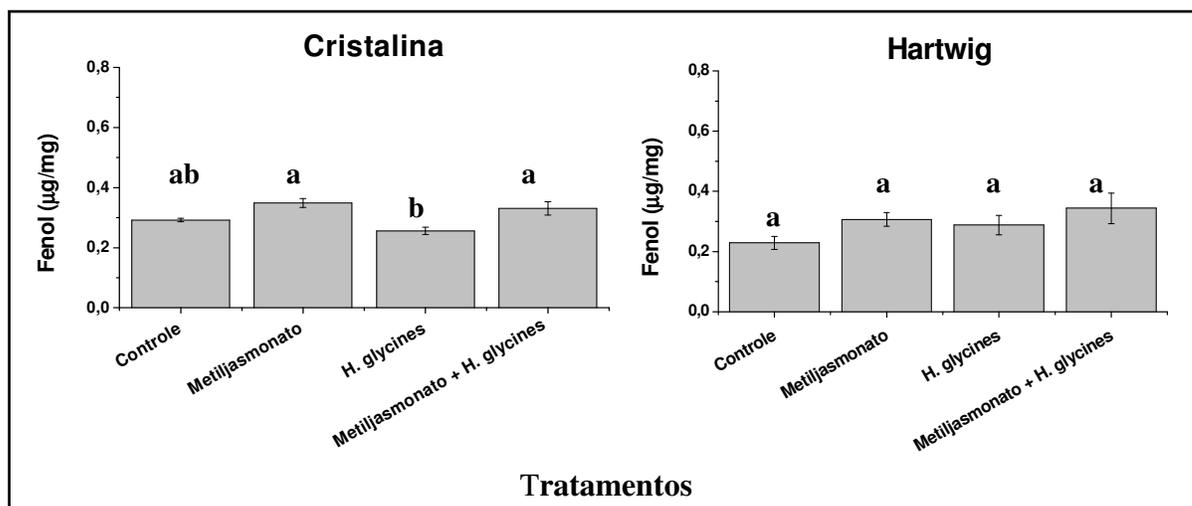


Figura 15: Fenóis totais em raízes de soja Cristalina e Hartwig tratadas com metiljasmonato e infectadas com *Heterodera glycines* com 48 h após início dos tratamentos. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Duncan (n = 3; barra = SE).

A análise qualitativa de fenóis em HPLC (figura 16) mostrou que, ao contrário do demonstrado no trabalho de Haruta & Constabel (2001), não ocorreram alterações nos tratamentos com metiljasmonato e posterior infecção com *M. javanica*. Haruta & Constabel (2001) notaram que troncos de *Populus tremuloides* Michx perfurados por um besouro apresentava a síntese induzida de um fenol específico, com posterior aumento da atividade da PPO possivelmente como um mecanismo de defesa da planta ao inseto.

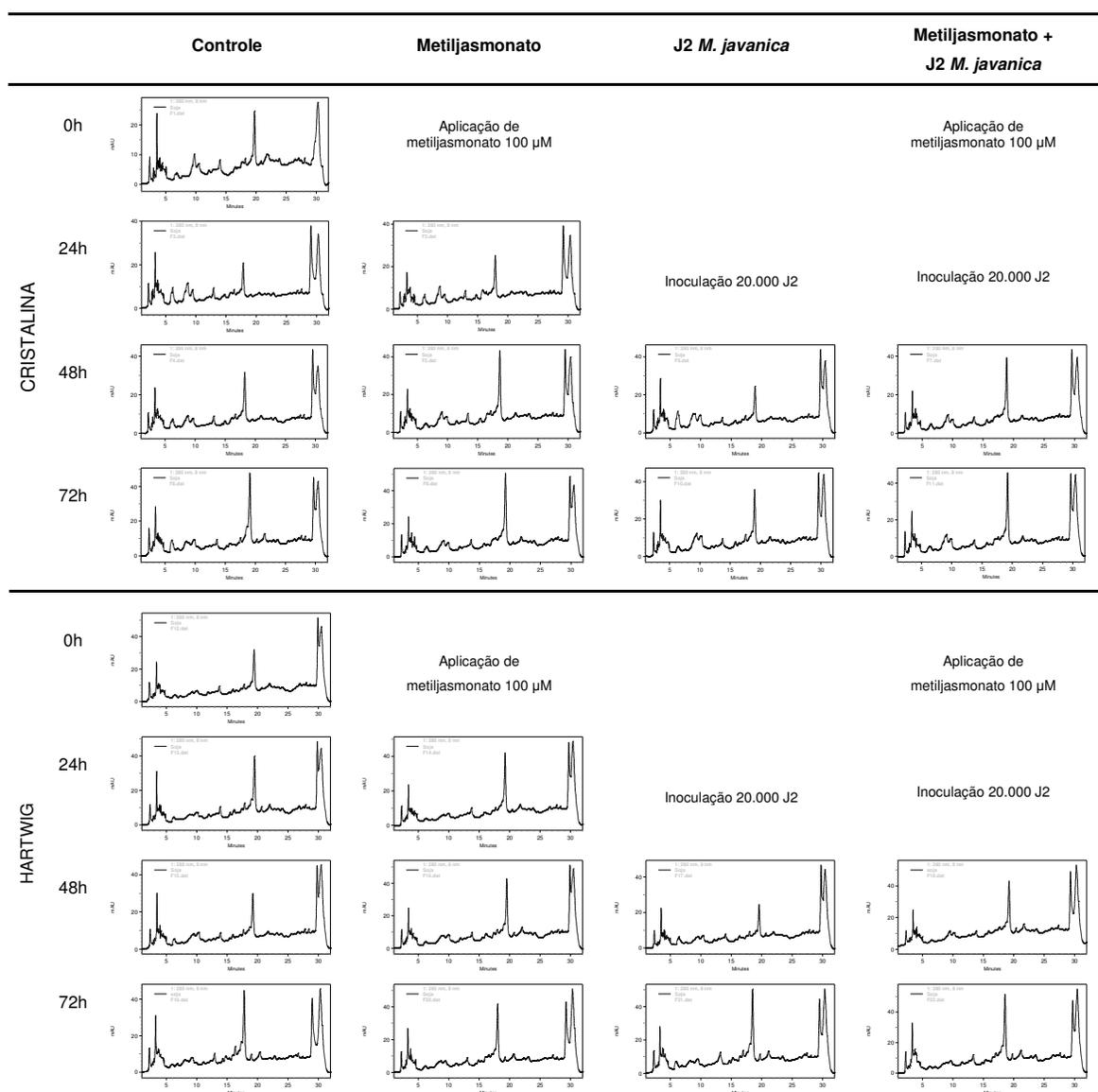


Figura 16: Perfil de fenóis totais (280 nm) de raízes de plântulas de soja tratadas com metiljasmonato, J2 de *Meloidogyne javanica* e com metiljasmonato e posterior inoculação com o nematóide. O tempo 0h corresponde a 24 h após o tratamento com metiljasmonato.

Também não foram observadas variações qualitativas marcantes nos extratos etanólicos das raízes de soja tratadas com metiljasmonato e infectadas com *H. glycines*, após 48 h da inoculação, conforme se verifica nos perfis de fenóis apresentados na figura 17.

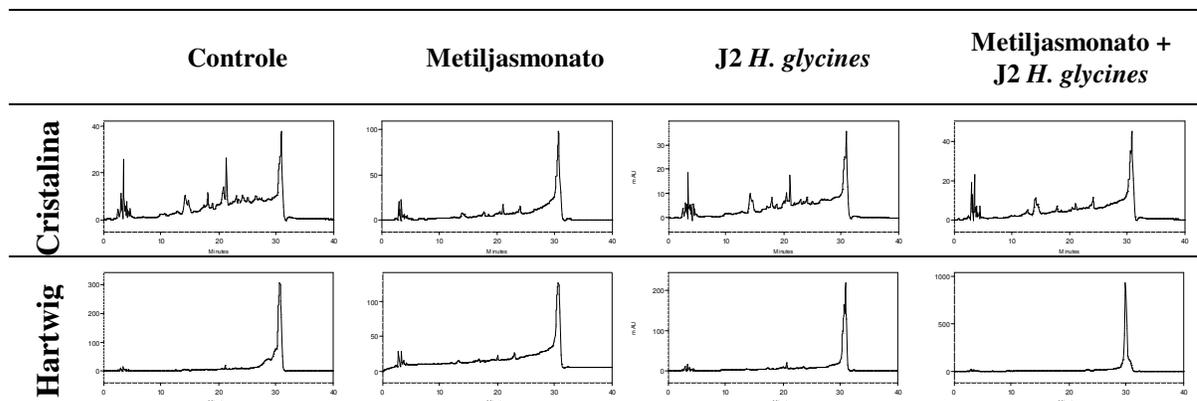


Figura 17: Perfil de fenóis totais (280 nm) de raízes de soja com 48 h da aplicação de metiljasmonato e 24 h após a inoculação com *Heterodera glycines*.

4.8.2. Atividade e expressão da PPO

Novamente, comparado ao controle, observou-se aumento da atividade de PPO nas raízes das duas variedades de soja quando tratadas com metiljasmonato (figura 18).

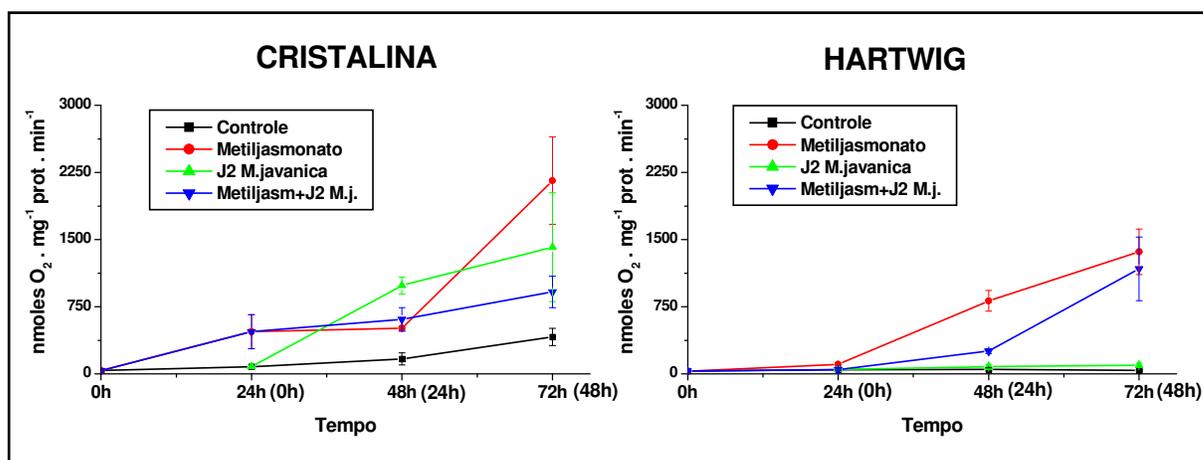


Figura 18: Atividade de polifenoloxidase em raízes de plântulas de soja tratadas ou não com metiljasmonato (100 μ M) e inoculadas ou não com 20.000 larvas J2 de *Meloidogyne javanica*. O tempo 0h corresponde a 24 h após o tratamento com metiljasmonato. Os tempos entre parênteses correspondem ao período de inoculação do nematóide após a exposição ao metiljasmonato (n = 4; barra = SE).

Porém comparando-se apenas os dados de metiljasmonato deste ensaio com aqueles do ensaio da figura 6, observamos que houve manutenção da magnitude de resposta, mas uma inversão. Ou melhor, no ensaio da figura 6 observou-se que o controle da variedade Cristalina tinha atividade de PPO um pouco menor que de Hartwig e que a resposta final, com 72 h de exposição a metiljasmonato, era menos do que a metade da observada em Hartwig, ou melhor, de, aproximadamente, 500 nmoles O₂/mg proteína.min, enquanto que em Hartwig era de, aproximadamente, 1200 nmoles O₂/mg proteína.min. Os resultados do ensaio integrado (figura 18) mostram que o controle da variedade Cristalina teve maior atividade de PPO que o controle de Hartwig. Nas plantas tratadas com metiljasmonato, em 72 h o aumento de PPO em Cristalina foi o dobro de Hartwig.

Devido a insuficiente quantidade de inóculo de *H. glycines*, não foram feitas as avaliações de PPO no ensaio integrado, dando-se preferência às análises de expressão, como será mostrado posteriormente. Assim, as comparações de atividade de PPO entre o ensaio integrado e o da figura 7 serão feitas apenas com material inoculado com *M. javanica*. No ensaio cujos dados foram apresentados na figura 7, no qual plantas de soja foram inoculadas com *M. javanica*, apenas Hartwig inoculada apresentou algum aumento na atividade de PPO, 72 h após a inoculação, mas em nível não muito superior a 200 nmoles O₂/mg proteína.min. Os resultados de atividade de PPO no ensaio integrado (figura 18) mostraram que esta variedade apresentou um aumento bastante discreto, pequeno comparado ao de Cristalina, que atingiu valor próximo a 1500 nmoles O₂/mg proteína.min. Da mesma forma que comentamos acima, sobre as atividades das raízes das plantas quando expostas somente ao metiljasmonato, também aqui houve uma inversão, ou seja, os dados da figura 6 foram opostos aos da figura 18. Não sabemos explicar estas diferenças entre um ensaio e outro, mas chama a atenção a grande dispersão dos dados em ambos ensaios, principalmente nos de inoculação com

nematóides. Apesar de ter sido tomado todo o cuidado para manutenção da homogeneidade das plantas, do modo de inoculação, do oferecimento de metiljasmonato, acredita-se que em parte, esta variação seja devida à variações experimentais.

No entanto, um dado que chama a atenção no ensaio integrado e que ocorreu com as duas variedades, foi a menor atividade de PPO em plantas que foram previamente expostas a metiljasmonato e depois inoculadas com nematóides (figura 18). Isto será discutido abaixo, em relação aos dados de expressão dos clones isolados JH1 e JH2.

Com os clones JH1 e JH2 foram feitas as análises da expressão de PPO usando primers específicos aos dois fragmentos e RT-PCR semi-quantitativo. Para isto, utilizou-se cDNA primeira fita de RNA total extraído de raízes das plantas com 48 h da inoculação com os nematóides. As figuras 19a e 19b mostram as quantidades de RNA usadas para a produção da primeira fita de cDNA, como uma forma de controle de reação. As figuras 19c-f mostram os resultados da expressão de PPO. Para o cálculo dos valores mostrados nos gráficos relativos aos RT-PCR's com as sondas (figuras 19c-f) foram divididos os valores de densidade das bandas pela densidade das bandas de RNA. As densidades foram quantificadas pelo software Quantity One da BioRad no aparelho GelDoc da mesma empresa. Nas raízes das plantas expostas a metiljasmonato foi observado aumento de expressão apenas com a sonda JH1 (figuras 19c e 19e). A expressão de PPO em plantas infectadas com J2 de *M. javanica* aumentou com JH1 e para as duas variedades de soja, mas proporcionalmente mais para Hartwig. Este resultado de certa forma contrasta com aquele da figura 18. Os tratamentos de plantas de Hartwig com metiljasmonato e metiljasmonato + nematóide, que levaram ao aumento de PPO (figura 18) mostraram aumento de transcrição de JH1 (figura 19e) mais acentuado apenas no tratamento com metiljasmonato. Ainda com JH1, plantas de Cristalina tratadas com metiljasmonato ou inoculadas com nematóides apresentaram aumento de

transcrição de JH1 (figura 19c), coincidindo com os resultados obtidos nas dosagens de atividade da PPO (figura 18).

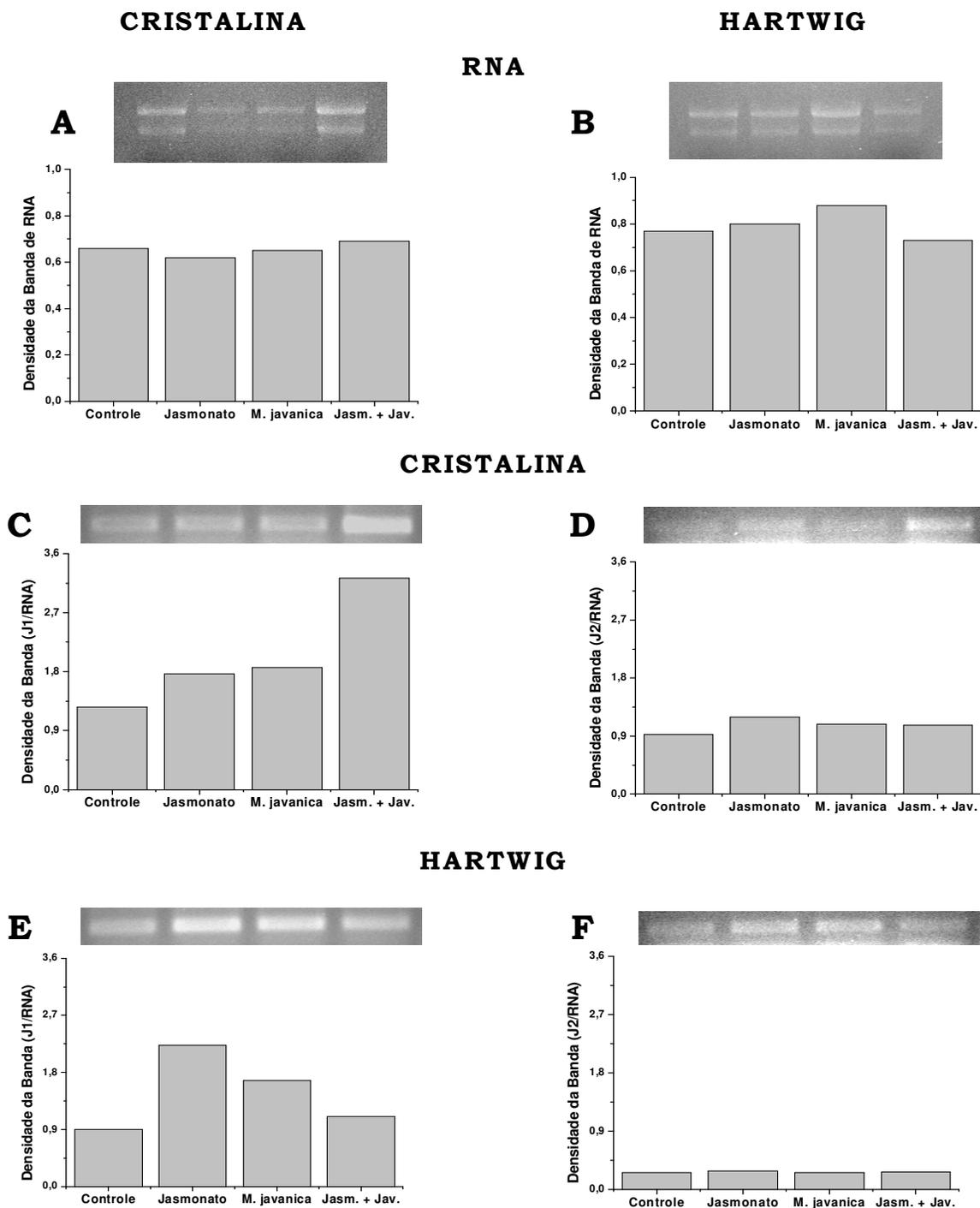


Figura 19: Bandas de RNA total de raiz de soja Cristalina (A) e Hartwig (B) extraídos de plantas tratadas com metiljasmonato e inoculadas com larvas J2 de *Meloidogyne javanica* e usadas na síntese de cDNA e para a análise de transcrição por RT-PCR usando primers específicos para os clones parciais JH1 (C,E) e JH2 (D,F) de polifenoloxidase de soja.

A transcrição não expressiva de JH2 em todos os casos e a falta de similaridade entre a transcrição de JH1 e a resposta de atividade de PPO em Hartwig podem estar relacionados ao fato de que apenas alguns genes de PPO estariam respondendo ao tratamento, uma vez que PPO em soja parece ser composta de uma família multigênica, como pode ser visto pela análise de Southern (figura 12). Assim, o aumento de atividade para metiljasmonato aparentemente estaria relacionado com o gene codificando para a PPO-JH1, mas outro gene que não aqueles identificados para JH1 e JH2, poderia ser o responsável pelo aumento de atividade nas plantas de Hartwig expostas a metiljasmonato e depois inoculadas com *M. javanica*. Porém, aparentemente existe algum mecanismo de controle da expressão de um gene sobre o outro, o que talvez pudesse explicar porque quando combinados, metiljasmonato + nematóide, a atividade é menor que nos tratamentos isolados, ou seja, apenas exposição a metiljasmonato e apenas inoculação com nematóide (figura 18).

O mesmo foi feito com as raízes de plantas infectadas com J2 de *H. glycines* (figura 20) e neste caso, aumento de transcrição foi verificado somente com JH1 e em Cristalina (figura 20c). Isto sugere novamente a participação de diferentes genes de PPO.

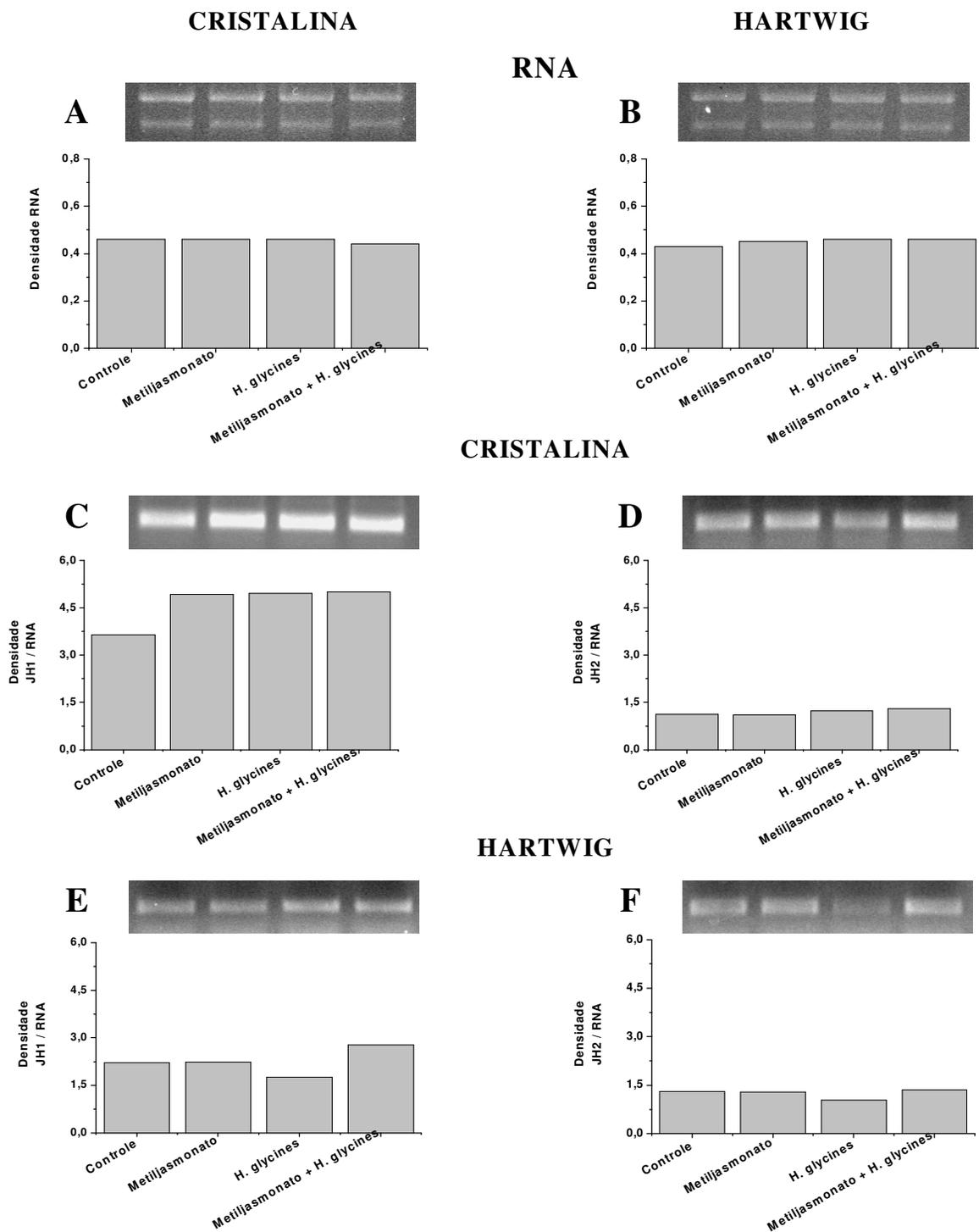


Figura 20: Bandas de RNA de raiz de soja Cristalina (A) e Hartwig (B) extraído de plantas tratadas com metiljasmonato e infectadas com larvas J2 de *Heterodera glycines* e usado na síntese de cDNA e para a análise de transcrição por RT-PCR usando primers específicos para os clones parciais JH1 (C,E) e JH2 (D,F) de polifenoloxidase de soja.

4.8.3. Efeito do metiljasmonato em soja infectada com nematóides

As figuras abaixo mostram as quantidades de ovos/J2 extraídos das raízes de soja após 35 dias da inoculação de *M. javanica* (figura 21) e *H. glycines* (figura 22) em plantas tratadas previamente com metiljasmonato. Tabelas com as análises de variância são encontradas no Apêndice. Deve ser lembrado aqui que a proposição desta tese era estudar o papel de PPO nos momentos iniciais da entrada de juvenis J2 nas raízes de soja, tentando relacionar isto com o modo de penetração de cada nematóide. Assim, ainda que a avaliação tenha sido feita com 35 dias, ela estaria refletindo algo que aconteceu bem antes e que se refletiria no sucesso de maior ou menor J2 formarem sítios de alimentação ou sincícios. Caso metiljasmonato induza PPO, como mostrado anteriormente, e se PPO possui algum papel na resistência, seria esperado que as plantas tratadas tivessem menores contagens que os controles, principalmente com a variedade suscetível Cristalina.

Uma primeira observação é que o número de ovos de modo geral foi bastante baixo em todas as situações. Isto provavelmente reflete a avaliação feita aos 35 dias, quando a oviposição poderia ter apenas começado, uma vez que o tempo de um ciclo de vida de *M. javanica* e *H. glycines* apresenta uma duração variável de 4 a 6 semanas (Brito et al, 1999; Ferraz et al, 2001). Entretanto, como já comentado acima, baixos ou não, os valores refletiriam os tratamentos aos quais as plantas foram submetidas.

Observou-se também, que as plantas controle das duas variedades inoculadas com 500 J2 de *M. javanica* apresentaram contagem de ovos bem menor do que aquelas inoculadas com 1.000 J2. Mas isto não foi observado com *H. glycines*. Outro fato é que as contagens de ovos em Hartwig foram menores que em Cristalina, principalmente com a inoculação com 1.000 larvas J2, confirmando sua maior resistência a ambos nematóides.

Quando se fez a prévia exposição a metiljasmonato e depois a inoculação com J2,

observou-se a redução, como preconizado acima, nas plântulas de Cristalina inoculadas com 1.000 J2 de ambos nematóides. Para Hartwig, também houve esta redução para plantas inoculadas com 1.000 J2 de *M. javanica*. Não houve diferença estatística para Hartwig inoculada com *H. glycines*.

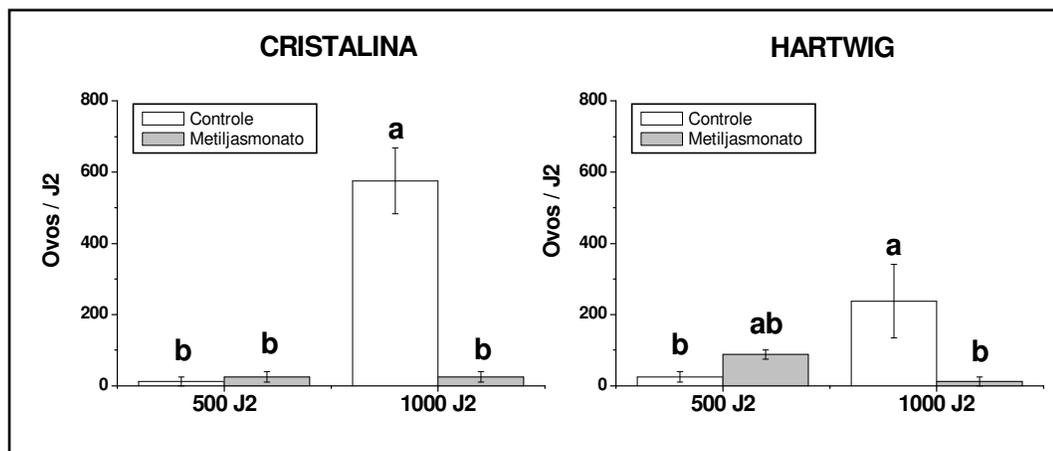


Figura 21: Ovos e juvenis de *Meloidogyne javanica* extraídos das raízes de plantas de soja suscetível (Cristalina) e resistente (Hartwig) tratadas ou não com metiljasmonato, após 35 dias da inoculação. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Duncan ($n = 4$; barra = SE).

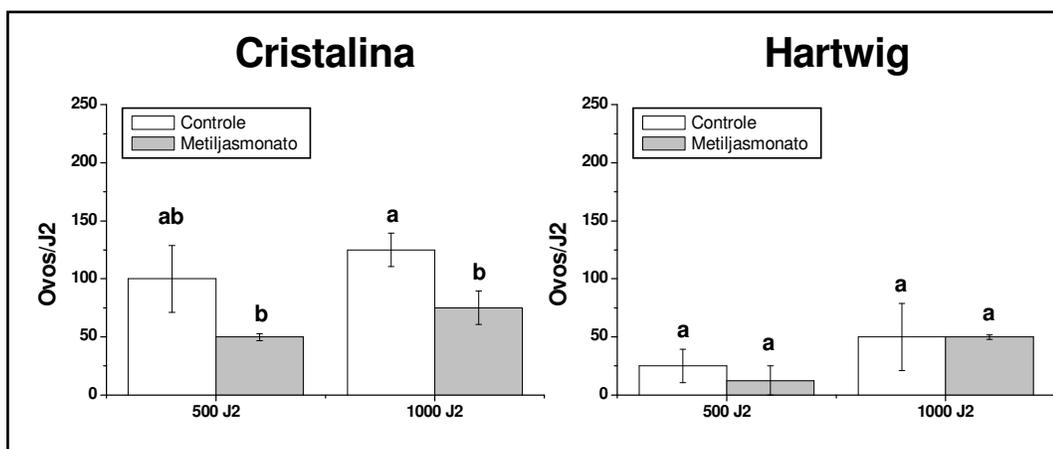


Figura 22: Ovos e juvenis de *Heterodera glycines* extraídos das raízes de plantas de soja suscetível (Cristalina) e resistente (Hartwig) tratadas ou não com metiljasmonato, após 35 dias da inoculação. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Duncan ($n = 4$; barra = SE).

Tomateiros tratados com metiljasmonato apresentaram aumento na atividade da PPO e diminuição no desenvolvimento de larvas de insetos que se alimentaram dessas plantas (Felton *et al.*, 1989; Thaler *et al.*, 2001). No trabalho de Li & Steffens (2002), com plantas transgênicas de tomate com super-expressão da PPO, houve aumento na resistência a essa bactéria. Grundler *et al.* (1997) observaram que raízes de *A. thaliana* infectadas com *H. glycines* apresentaram escurecimento e necrose das células que entraram em contato com o nematóide durante a fase de infecção. Entretanto, apenas parte dos nossos resultados são concordantes com os trabalhos acima, ou diminuição da severidade da doença/ataque devido à exposição a metiljasmonato. Houve redução apenas com inoculação com 1.000 larvas. Inclusive, e curiosamente, o que se observou foi aumento do número de ovos quando a inoculação foi feita com 500 juvenis com os dois nematóides. É possível que isto esteja relacionado com a quantidade de inóculo, uma vez que os controles de 500 larvas J2 produziram menos ovos que aqueles com 1.000 larvas J2. Todas as inoculações foram feitas no mesmo dia, com o mesmo lote de juvenis, com plantas da mesma idade, e que ficaram durante os 35 dias nas mesmas condições. Sabe-se que baixos níveis de inóculo podem inclusive provocar o crescimento de plantas, sendo sugerido que um estresse moderado leva a planta a responder, aumentando o ganho de massa seca (Carneiro *et al.*, 1999 e referências do mesmo artigo). Assim, os resultados apontam que o aumento de PPO induzido por metiljasmonato pode sim estar relacionado ao aumento da resistência, porém não foi possível detectar em qual fase da infecção. A prévia exposição foi feita 24 h antes da inoculação e as medidas de PPO foram feitas até 48 h da inoculação. Em 48 h as larvas poderiam estar desde penetrando as raízes até formando o sítio de alimentação/sincício. Excluimos, porém, a possibilidade de que o metiljasmonato pudesse ter agido diretamente sobre as larvas antes da penetração, pois larvas incubadas com a solução de 100 μ M de metiljasmonato continuaram a

apresentar motilidade semelhante às larvas controle após 48 h de incubação com água, quando observadas em estéreo microscópio.

Portanto, concluímos que metiljasmonato pode estar induzindo maior resistência de Cristalina aos nematóides. Isto seria concordante com os dados de atividade de PPO e de transcrição de JH1. Porém, esta relação não pode ser estabelecida para Hartwig no caso de *H. glycines* (não houve aumento de transcrição).

No presente trabalho isolamos apenas dois clones de PPO. Talvez o isolamento feito a partir de folhas, que tem maior atividade de PPO, e o uso em ensaios de expressão como os realizados aqui, possam oferecer uma visão melhor sobre o papel na resistência de soja a nematóides, uma vez que PPO é uma família multigênica nesta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamson, W. G., McCrea, K. D., Whitwell, A. J. & Vernieri, L. A., 1991. The role of phenolics in Goldenrod Ball Gall resistance and formation. *Biochem. System. Ecol.* 8(19):615-622.
- Acedo, J. R. & Dropkin, V. H., 1982. Technique for obtaining eggs and juveniles of *Heterodera glycines*. *J. Nematol.* 3(14):318-320.
- Amalraj, S. F. A., 1995. Enzyme activity associated with resistance in potato to the early stage of *Globodera pallida* infection. *Nematol. Medit.* 2(23):199-202.
- Baermann, G., 1917. Eine einfache methode zur auffindung von ankvlostomum (nematoden) larven in Erdproben. *Tijdschr. Ned.-Indie* 57:131-137.
- Baldrige, G. D., O'Neill, N. R. & Samac, D. A., 1998. Alfafa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Mol. Biol.* 38:999-1010.
- Bashan, Y., Okon Y. & Henis Y., 1985. Detection of cutinases and pectic enzymes during infection of tomato by *Pseudomonas syringae* PV tomato. *Phytopathology* 75:940-945.
- Bashan, Y., Okon, Y. & Henis, Y., 1987. Peroxidase, polyphenoloxidase, and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato in tomato plants. *Can. J. Bot.* 65:366-372.
- Bird, D. Mck. & Wilson, M. A., 1994. DNA sequence and expression analysis of root-knot nematode-elicited giant cell transcripts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7:419-424.
- Brito, C. H., Sedyama, T., Pozza, E. A. & Dias, W. P., 1999. Níveis de inoculo e época para a avaliação de populações de *Heterodera glycines* Ichinohe em soja. *Ciênc. Agrotec.*, 4(23):836-840.
- Bonato, E. R., Costamilan, L. M., Filho, A. F., Silva, J. F. V. & Bertagnolli, P. F., 2002.

- Distribuição do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) no Rio Grande do Sul. Nematol. Bras. 26(1):97-100.
- Boss, P. K., Gardner, R. C., Janssen, B. J. & Ross, G. S., 1995. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. Plant Mol. Biol. 27:429-433.
- Bostian, A. L., Schmitt, D. P. & Barker, K. R., 1984. Early growth of soybean as altered by *Heterodera-glycines*, Phenamiphos and or Alachlor J. Nematol. 16(1):41-47.
- Carneiro, R. G., Ferraz, L. C. C. B. & Mazzafera, P., 1999. Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. J. Nematol. 31(3):348-355.
- Constabel, C. P. & Ryan, C. A., 1998. A survey of woud and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. Phytochemistry 4:507-511.
- Constabel, C. P., Bergey, D. R. & Ryan, C. A., 1995. Systemin activates synthesis of woud-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:407-411
- Conti, G. G, Bocci, A. M. & Sprocati, M. T., 1982. Peroxidase and polyphenoloxidase isoenzymes, hypersensitive reaction and systemic induced resistance in *Nicotiana-glutinosa* L infected with tobacco mosaic-virus. Riv. Patol. Vegetale 18(1/2):83-102.
- Coolen, W. A. & D'Herde, C. J., 1972. A method for the quantitative extration of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agricultural Research Centre, 77 p.
- Dry, I. B. & Robinson, S. P., 1994. Molecular-cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. Plant Mol. Biol. 1(26):495-502
- Eicken, C., Krebs, B & Sacchettini J. C., 1999. Catechol oxidase – struture and activity. Curr. Opin. Strutural Biol. 9:677-683.
- Endo, B.Y., 1992. In: Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode, R.D. Riggs &

- J.A. Wrather (eds), APS Press, pp. 37-49.
- Felton, G. W. & Korth, K. L., 2000. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:309-314.
- Felton, G.W. & Summer, C. B., 1993. Potential role of ascorbate oxidase as a plant defense protein against insect herbivory. *J. Chem. Ecol.* 19(7):1553-1568.
- Felton, G. W., Summers, C. B. & Mueller, A. J., 1989. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper. *J. Chem. Ecol.* 20:639-650.
- Ferraz, L. C. C. B., Asmus, G. L., Carneiro, R. G., Mazzafera, P & Silva, J. F. V., 2001. Relações parasito-hospedeiro na meloidoginose da soja. Embrapa soja, Londrina, 127p.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45:1523-1540.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. & Martin, G. R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single genetic specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(23):8998-9002.
- Ganguly, S. & Dasgupta, D. R., 1984. Sequential development of polyphenol oxidase in resistant and susceptible tomatoes inoculated with the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematol. Medit.* 12(1):15-22.
- Giebel, J., 1982. Mechanism of resistance to plant nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20:257-279.
- Goddijn, O. J. M., Lindsey, K., van der Lee, F. M., Klap, J. C. & Sijmons, P. C., 1995. Differential gene-expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter gusa fusion constructs. *Plant J.* 4(5):863-873.
- Goy, P. A., Felix, G., Metraux, J. P. & Meins, F., 1992. Resistance to disease in the hybrid

- Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive levels of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:11-21.
- Grundler, F. M. W., Sobczak, M. & Lange, S., 1997. Defence responses of *Arabidopsis thaliana* during invasion and feeding site induction by the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 419-429.
- Hansen, E., Harper, G., McPherson, M.J. & Atkinson, H.J., 1996. Differential expression patterns of the wound-inducible transgene *wun1-uidA* in potato roots following infection with either cyst or root nematodes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:161-170.
- Haruta, M., Pedersen, J. A., Constabel C. P., 2001. Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol. Plant.* 112(4):552-558.
- Hättenschwiler, S. & Vitousek, P. M., 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Tree* 15(6):238-243.
- Hussey, R. S. & Williamson, V. M., 1998. In: *Plant and Nematology Interactions*, K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham (eds), ASA, CSSA, SSSA, pp. 87-108.
- Hussey, R. S., Davis, E. L. & Ray, C., 1994. In: *Advances in Molecular Plant Nematology*, F. Lamberti (ed), Plenum Press, pp. 233-249
- Husey, R. S., Davis, E. L. & Baum, T. J., 2002. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 14(3):183-194.
- Jukanti, A. K., Bruckner, P. L., Habernicht, D. K., Foster, C. R., Martin, J. M. & Fisher AM., 2003. Extraction and activation of wheat polyphenol oxidase by detergents: Biochemistry and applications. *Cereal Chem.* 80(6):712-716.
- Kiraly, Z., Barna, B. & Ersek, T., 1972. Hypersensitivity as a consequence, not cause, of plant

- resistance to infection. *Nature* 239(5373):456-&.
- Korth, K. L. & Dixon, R. A., 1997. Differential transcript accumulation near wound sites in response to insector mechanical damage. *Plant Physiol.* 114:38-38.
- Lamb, C.J., Ryals, J., Ward, E.R. & Dixon, R.A., 1992. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Biotechnology* 10(11):1436-1445
- Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. & Sanchez-Ferrer, A., 2000. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* 379(1):1-6.
- Li, L. & Steffens, J. C., 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215:239-247.
- Maxemiuc-Naccache, V. & Dietrich, S. M. C., 1985. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust.). *Rev. Bras. Bot.* 8:185-190.
- Mazzafera, P., Gonçalves, W. & Fernades, J.A.R., 1989. Fenóis, peroxidase e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 48:131-142.
- Mazzafera, P., Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55: 285-296.
- Mcconn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E. & Browse, J., 1997. Jasmonate is essential for insect defense Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:5473-5477.
- Molinari, S. & Miacola, C., 1997. Catalase induction in galls produced by *Meloidogyne* - tomato root interactions *in vitro*. *Nematol. Medit.* 25(2):199-303.
- Moore, David. Section IV: Analysis of DNA Sequences by Blotting and Hibridization. In: Ausubel, Frederick M. *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc., 1987. 3v. v. 1, Unit 2-9A.

- Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inzé, D., Montagu, M.V. & Gheysen, G., 1995. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:371-378.
- Oka, Y., Chet, I. & Spiegel, Y., 1997a. Are pathogenesis-related proteins induced by *Meloidogyne javanica* or *Heterodera Avenae* invasion? *J. Nematol.* 29:501-508.
- Oka, Y., Chet, I. & Spiegel, Y., 1997b. An immunoreactive protein to wheat-germ agglutinin antibody is induced in oat roots following invasion of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* and by jasmonate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:961-969
- Opperman, C. H. & Conkling, M. A., 1998. In: *Plant and Nematology Interactions*, K.R. Barker, G.A. Pederson & G. L. Windham (eds), ASA, CSSA, SSSA, pp:239-250
- Opperman, C. H., Taylor, G. G. & Conkling, M. A., 1994. Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene. *Science* 263:221-223.
- Pearson, W. R., Wood, T., Zhang, Z. & Miller, W., 1997. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 46:24-36.
- Plowright, R. A., Grayer, R. J., Grill, J. R., Rahman, M. L. & Harborne, J. B., 1996. The Induction of Phenolic Compounds in Rice After Infection by the Stem Nematode *Ditylenchus angustus*. *Nematologica* 42:564-578.
- Rahimi, S., Perry, R.N. & Wright, D.J., 1993. Induction and detection of pathogenesis-related proteins in leaves and roots of potato plants infected with pathotypes of *Globodera pallida*. *Fundam. Appl. Nematol.* 16(6):549-556.
- Rahimi, S., Wright, D.J. & Perry, R.N., 1998. Identification and localisation of chitinases induced in the roots of potato plants infected with the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Fundam. appl. Nematol.* 21:705-713
- Rescigno, A., Sollai, F., Rinaldi, A. C., Soddu, G. & Sanjust, E., 1997. Polyphenol oxidase

- activity staining in polyacrylamide electrophoresis gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 34:155-159.
- Ray, H. & Hammerschmidt, R., 1998. Responses of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53:81-92.
- Rojas, M. L., Degomez, V. M. & Ocampo, C. A., 1993. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43(3):209-219.
- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J. P., Rosahl, S., Ortego, F., Castañera, P. & Sánchez-Serrano, J., 1999. Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(3):1146-1151.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 2ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory, 1989. 3v. v.3.
- Silva, J. F. V., 1999. Um histórico. IN: O nematóide de cisto da soja: A experiência Brasileira. Sociedade Brasileira de Nematologia, Jaboticabal, 132p.
- Silva, J. F. V., Ferraz, L. C. C. B. & Arias, C. A., 2001. Herança da resistência a *Meloidogyne javanica* em soja. *Nematropica* 31:211-219.
- Sivakumar, M. & Vadivelu, S., 1995. Biochemical changes induced by the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 on the roots of carrot (*Daucus carota* L.) II. phenol oxidase enzymes. *Current Nematol.* 6:67-69
- Steffens, J.C., Harel, E. & Hunt, M.D., 1994. Polyphenol oxidase. *Recent Adv Phytochem.* 28:275-312.
- Stewart, C. N. & Via, L. E., 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for rapid fingerprinting and other pcr applications. *Biotechniques* 14(5):748.

- Swain, T., Hillis & W. E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68.
- Thaler, J. S., Stout, M. J., Karban, R. & Duffey, S. S., 2001. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecol. Entomol.* 26:312-324.
- Thipyapong, P., Hunt, M. D. & Steffens, J. C., 1995. Systemic wound induction of potato (*Solanum-tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 40:673-676
- Thygesen, P. W., Dry B. & Robinson, S. P., 1995. Polyphenol oxidase in potato. a multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109:525-531.
- Thipyapong, P., Joel, D. M. & Steffens, J. C., 1997. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiol.* 113:707-718.
- Tscharntke, T., Thessen, S., Dolch, R. & Boland, W., 2001. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochem Systemat. Ecol.* 29:1025-1047.
- VanderEyken, W., Engler, J. D., Inzé, D., Vanmontagu M. & Gheysen, G., 1996. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. *Plant J.* 9:45-54.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C. A., Cook, R. J. & Browse, J., 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7209-7214.
- Williamson, V.M., 1998. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:277-293
- Williamson, V. M. & Gleason, C. A., 2003. Plant-nematode interactions. *Curr. Opin Plant Biol.* 6:327-333.
- Wyss, U., Grundler, V.M.W. & Munch, A., 1992. The parasitic behavior of 2nd-stage

- juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38(1):98-111.
- Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N. & Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48(7): 2732-2735.
- Zacheo, G., Bleve-Zacheo, T. & Melillo, M.T., 1997. In: Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions. C. Fenoll, F.M.W. Grundler & S.A. Ohl (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 201-213.

6. APÊNDICE

Análise de variância para Ovos e J2 de *M. javanica* em raiz se soja Cristalina

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	921717,63	3	307239,219	34,91 ***
Resíduo	105624,88	12	8802,073	
Total	1027342,50	15		
Desvio Padrão residual (s): 93,819			C.V.= 58,9%	
* 5% **1% *** 0,1%				

Análise de variância para Ovos e J2 de *M. javanica* em raiz se soja Hartwig

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	127968,31	3	42656,105	5,65*
Resíduo	90624,91	12	7552,076	
Total	218593,22	15		
Desvio Padrão residual (s): 86,903			C.V.= 95,9%	
* 5% **1% *** 0,1%				

Análise de variância para Ovos e J2 de *H. glycines* em raiz se soja Cristalina

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	12500,00	3	4166,667	5,71*
Resíduo	8750,00	12	729	
Total	21250,00	15		
Desvio Padrão residual (s): 27,003			C.V.= 30,9%	
* 5% **1% *** 0,1%				

Análise de variância para Ovos e J2 de *H. glycines* em raiz se soja Hartwig

	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	4218,67	3	1406,225	2,45 NS
Resíduo	6874,80	12	572,900	
Total	11093,47	15		
Desvio Padrão residual (s): 23,935			C.V.= 69,6%	
* 5% **1% *** 0,1%				

CAPÍTULO II

**ATIVIDADE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
POLIFENOLOXIDASES DOS PALMITOS DAS
PALMEIRAS JUÇARA (*Euterpe edulis*), AÇAIZEIRO
(*Euterpe oleracea*) E PUPUNHEIRA (*Bactris gasipaes*)**

1. INTRODUÇÃO

1.1. O palmito

O palmito é composto pelo meristema apical da palmeira e por folhas jovens, imaturas, derivadas a partir desta região de crescimento. É largamente utilizado em saladas, sopas e outros pratos. Apesar do palmito poder ser extraído de algumas variedades de palmeiras, no Brasil ele tem sido explorado principalmente a partir de duas espécies, *Euterpe edulis* e *Euterpe oleracea*, tendo a primeira o nome comum de juçara e a segunda de açazeiro (Tabora Jr. *et al.*, 1993). Mais recentemente o palmito da pupunheira (*Bactris gasipaes*) vem ganhando espaço no mercado brasileiro (Bovi, 1998). Apesar do Brasil ser responsável por 70 % do palmito comercializado no mundo, a maior parte de sua produção é consumida no próprio país, o que chega a 96,7 % do palmito produzido internamente, de acordo com dados de 1992 (Tabora Jr. *et al.*, 1993; Clay, 1997). De acordo com dados de 2002, França, Argentina, Estados Unidos e Espanha são os principais importadores do palmito produzido no Brasil (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pupunha/PalmitoPupunheira/importancia.htm>; <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>).

Até o final dos anos 60, a maior parte do palmito consumido no país era obtida da palmeira juçara. Esta espécie é restrita à Mata Atlântica (Galetti & Fernandez, 1998) e por ser monocaule (estipe único), a planta é sacrificada para a extração do palmito. Uma vez que sua exploração é feita de forma extrativista, a população natural foi muito reduzida ao longo dos anos. Atualmente, a maior parte do palmito produzido no país vem da extração do açazeiro, que por perfilhar, assim possuindo múltiplos caules, permite a regeneração da palmeira. O estuário do Rio Amazonas é o principal local de extração deste palmito e estimativas de 1980 mostravam que, já naquela época, apenas 16 % da produção de palmito no Brasil vinha da

região sul, conseqüentemente, originária de juçara (Galetti & Fernandez, 1998). Dados do IBGE (<http://www.ibge.gov.br>) mostram que cerca de 73 % da produção nacional de palmito, 41.119 toneladas em 2002, vieram da região Centro-Oeste.

Apesar das duas espécies, juçara e açai, não terem diferido estatisticamente em testes controlados para saber a preferência do consumidor, palmito da palmeira juçara tem características próprias, sendo considerado mais macio, de sabor mais suave e de coloração mais clara do que do açazeiro (Ferreira *et al.*, 1982a). O cultivo de juçara e açazeiro em São Paulo é uma realidade, mostrando-se como uma cultura viável e rentável (Tabora Jr. *et al.*, 1993). Dados do IBGE de 2002 mostram que a região Sudeste é a segunda, cerca de 14%, em produção de palmito no Brasil. A pupunheira, originária da região Amazônica é também produtora de bom palmito. Esta palmeira é perene e multicaule, produzindo um palmito de qualidade semelhante ao juçara (Ferreira *et al.*, 1982c). Comparativamente ao palmito juçara, o da pupunheira tem coloração um pouco mais amarelada e é um pouco mais doce. Uma das grandes vantagens da pupunheira é que em algumas localidades aonde é cultivada pode atingir a idade de corte a partir dos 18 meses (Bovi, 1998).

1.2. Polifenoloxidase em palmito

No que diz respeito aos estudos com polifenoloxidase (PPO) nos palmitos de juçara, açazeiro e pupunheira, eles não são muitos, apesar da importância desta enzima na qualidade do produto. Paschoalino (1978) cita que em um estudo sobre a qualidade do palmito brasileiro feito pelo Consulado Brasileiro em Nova Iorque, junto a importadores americanos, havia queixa da descoloração do produto (qualquer cor estranha à cor natural). Fazendo considerações sobre o desenvolvimento da descoloração durante o processamento do produto, o autor observa que PPO seria a responsável e que a mudança de cor se dava nas extremidades

do palmito. Mesmo tomando medidas para evitar esta alteração de cor, ainda ocorre o seu aparecimento após o tratamento com temperatura. O autor concluiu que: 1) devido ao rompimento celular pelo corte dos toletes, haveria exposição da enzima aos seus substratos, oxigênio e fenóis; 2) que o tratamento com temperatura aumentaria a possibilidade de oxigênio interno ao tecido atingir a região de corte, favorecendo a oxidação de fenóis por ação de PPO. Iaderoza & Draetta (1982) mostraram que o aparecimento da coloração rósea, seguido de marrom, iniciava-se após 20 min de aquecimento. Paschoalino (1978) recomendou que a exaustão mecânica do oxigênio, à temperatura ambiente, seria o método mais adequado para reduzir a descoloração, pois o oxigênio seria eliminado, inibindo a atividade de PPO.

No processamento atual do palmito recomenda-se a exaustão a vácuo, seguida de esterilização em banho-maria fervente ou autoclave (Silva & Nogueira, 1983, Tabora Jr. *et al.*, 1993). No entanto, ainda que PPO seja inibida nestes passos, entre a coleta no campo e o início do processamento, o palmito deve ser colocado em solução contendo inibidores (cloreto de sódio ~2 %) ou antioxidantes (ácido cítrico ~0,5 – 1 %). Já, durante o processamento, dependendo do método utilizado, também é feito o branqueamento, que é a fervura do palmito em solução de cloreto de sódio e ácido cítrico, em concentrações semelhantes às indicadas acima. Este procedimento também serve para eliminar microorganismos.

Para juçara e açazeiro determinou-se que a atividade de PPO é alta no palmito não processado (Ferreira *et al.*, 1982a). Por ter maior preferência pelo consumidor e, por produzir palmito de bom diâmetro e ter alto rendimento, o juçara tem sido utilizado em cruzamentos interespecíficos com o açazeiro, que perfilha (Ferreira *et al.*, 1982a; Tabora Jr. *et al.*, 1993). Híbridos entre as duas espécies também apresentam características organolépticas aceitáveis pelo consumidor (Ferreira *et al.*, 1982b), além de serem bastante produtivos (Tabora Jr. *et al.*, 1993; Kiyuna *et al.*, 1997). Por outro lado, mostrou-se que a atividade de PPO em palmito de

híbridos é semelhante ou maior que nos parentais (Ferreira *et al.*, 1982b).

Por sua vez, estudos com a pupunheira mostraram que as atividades de peroxidase e PPO no palmito eram muito baixas ou ausentes (Ferreira *et al.*, 1982a,b). Para PPO a atividade foi determinada em material liofilizado, que foi submetido à extração cetônica, com posterior ressuspensão em tampão fosfato. Utilizou-se catecol como substrato em ensaio espectrofotométrico.

Nos últimos anos tem aumentado muita a procura por alimentos “in natura”, preferência dada pelo consumidor preocupado com os produtos utilizados no processamento do produto (corantes, conservantes, antioxidantes, etc). Neste mercado, o palmito da pupunheira pode tornar-se bastante promissor, principalmente por apresentar baixa atividade de PPO, ou seja, não formando manchas marrons em decorrências de impactos no seu manuseio durante a colheita, transporte, etc. No entanto, levando-se em consideração que o palmito juçara apresenta melhor qualidade do que o da pupunheira, seria muito interessante a realização de estudos comparativos sobre a PPO. O fato da detecção de PPO em pupunheira ser baixa ou mesmo ausente merece várias considerações. A primeira poderia ser que a taxa de degradação da enzima seria muito alta, de forma que significativas atividades seriam detectadas apenas em tecido bastante novo. Os trabalhos sobre PPO no palmito de pupunheira foram realizados com o palmito desenvolvido, ou seja, em toletes na forma que são preparados para serem processados para enlatamento. Uma outra possibilidade é que o substrato utilizado nas dosagens enzimáticas não tenha sido adequado, podendo ser a PPO desta palmeira diferente das outras. Também, pode ser que a enzima necessite ativação, como observado para outras plantas, ou mesmo que a extração não tenha sido eficiente, pela falta da inclusão de detergentes no tampão de extração (Steffens *et al.*, 1994). Assim, ainda são necessários muitos estudos em pupunheira, e o estudo comparativo, principalmente através de métodos

moleculares, poderiam realmente informar se PPO não é expressa no palmito desta palmeira.

No nível bioquímico, pode-se mencionar apenas um trabalho com PPO em *E. edulis*. Nele, Lourenço *et al.* (1990) estudaram em PPO parcialmente purificada a inativação por calor e alguns parâmetros cinéticos. A fração protéica purificada rendeu cinco bandas em gel de acrilamida parcialmente desnaturante (SDS-PAGE), porém apenas três delas com atividade de PPO. O menor Km encontrado foi para CGA (0,59 mM) e a estimativa da massa molecular foi de 51 kDa. A enzima manteve-se estável no intervalo de pH entre 5,0 e 8,0, e estável em temperaturas entre 50 e 60°C. Inativação ocorria a 75°C, porém, em pH 4,0 ocorria inativação a 50°C depois de 30 min de tratamento.

Outros estudos com PPO em palmito foram feitos pelo grupo de Cadet (Robert *et al.*, 1995, 1996a,b, 1997, 1998; Ricquebourg *et al.*, 1996) com a palmeira *Acanthophoenix rubra*, endêmica nas ilhas Mascarenhas e Reunião. Porém, estes estudos verificaram a inibição da enzima por ácidos orgânicos e aminoácidos, e sua inativação térmica associada ao pH.

As medidas tomadas para a inibição da PPO logo após a coleta do palmito e o tratamento de temperatura para sua inativação acarretam custos no processamento do palmito. Assim, como citado anteriormente, redução na expressão gênica de PPO através do emprego de técnicas de biologia molecular poderia levar a uma economia significativa dos custos para a produção do palmito, assim como melhorar a qualidade final do produto, aumentando sua aceitação, principalmente no mercado internacional. No entanto, para atingir este estágio existe um longo caminho a ser percorrido, pois, além de não existirem estudos moleculares sobre a PPO do palmito, muito pouco se conhece sobre técnicas básicas de cultivo *in vitro* (Ferreira, 1982; Almeida & Kerbauy, 1996; Guerra & Handro, 1998) e nada sobre a transformação com *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, ou bombardeamento de partículas, que são técnicas necessárias para se obter uma planta transgênica. O presente

trabalho mostra os resultados de estudos iniciais neste sentido, tendo por fim o conhecimento mais detalhado sobre as diferenças de PPO de juçara, açazeiro e pupunheira, e gerar informações que julgamos também serem importantes para o melhoramento genético destas palmeiras.

2. OBJETIVOS

Estudar a PPO nos palmiteiros juçara, açazeiro e pupunheira sob o ponto de vista bioquímico e molecular. Os estudos bioquímicos compreendem dosagens da atividade da enzima e sua caracterização (substratos, K_m , latência, inibidores e K_i) em vários tecidos (folhas, raízes, e palmito) e a análise molecular compreende a caracterização de clones de PPO obtidos, utilizando-se primers degenerados e RT-PCR, e a expressão destes clones no palmito e folhas dessas palmeiras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As mudas de juçara, açazeiro e pupunheira foram obtidas nas condições descritas por Bovi *et al.* (1998) e a atividade enzimática analisada nos tecidos de plantas variando de 6 meses a 2 anos. O material foi coletado, congelado em N₂ líquido e armazenado em freezer (-20°C) antes da extração de proteínas. O material foi coletado da seguinte maneira:

- Raízes: o substrato foi retirado em água corrente e separadas as raízes novas das partes mais lignificadas, em lotes de raízes “novas” e “velhas”;
- Folíolos: os folíolos posicionados no meio de folhas de diferentes idades foram coletados separadamente;
- Palmito: obtido pelo descascamento do capitel e coletado próximo ao estipe.

Para a coleta de palmito destinado aos ensaios de manipulação de ácidos nucléicos, foram usadas outras mudas, sendo retirada apenas a porção compreendida pelo meristema apical e folhas jovens imediatamente acima e em torno dele, porção correspondente ao primeiro tolete de palmito, conforme mostra a figura 1 abaixo (Bovi, 1998). O material foi congelado em N₂ líquido imediatamente após sua coleta e armazenado em freezer (-80°C).

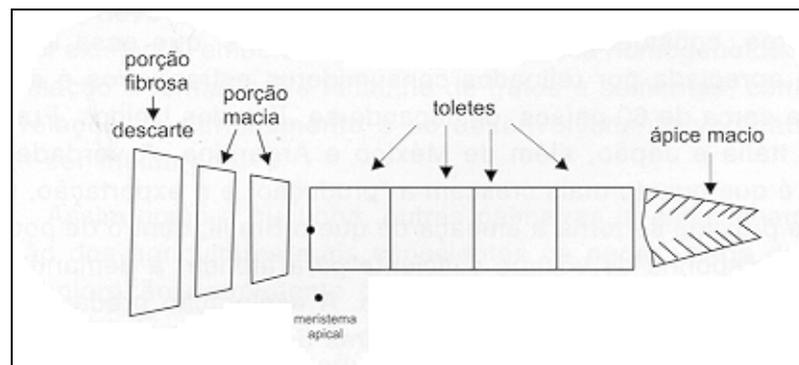


Figura 1. Divisões na região de extração do palmito.

3.2. Extração, dosagem da atividade de PPO e estudos cinéticos

A extração de proteínas foi feita de acordo com Mazzafera & Robinson (2000). O material foi congelado em N₂ líquido e extraído com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo ácido ascórbico 2 %. Polivinilpolipirrolidona (PVPP) foi adicionada ao meio de extração (1:10, p/p). Após centrifugação (36.200 g/30 min) o extrato foi dessalinizado em colunas PD10, misturado 1:1 (v/v) com glicerol 40 % e armazenado em freezer (-20 °C) para dosagem posterior. Foram feitos testes com dodecilsulfato de sódio (SDS) adicionado ao tampão de reação em diferentes concentrações para testar sua capacidade de ativação da PPO. Para os estudos sobre a distribuição da atividade de PPO nas várias partes das palmeiras (raízes, folhas, palmito, etc) foram testados vários substratos na concentração final de 2 mM no meio de reação. A estabilidade térmica da enzima foi testada por vários tempos entre 1 e 60 min a 50, 70 e 90°C. Foi estudado o melhor pH, entre 3,0 e 9,0 e a melhor temperatura, entre 15 e 50°C. Vários inibidores e substratos também foram testados e em diferentes concentrações (Robinson *et al.*, 1993). As dosagens de atividade foram feitas com eletrodo de oxigênio (Hansatech), que mede o consumo de O₂ do meio de reação (Mazzafera & Robinson, 2000).

3.3. Extração e determinações quantitativa e qualitativa de compostos fenólicos

Trinta plantas de cada palmito foram usadas neste experimento. As sementes que originaram essas plantas eram provenientes de ecotipos de Euterpe e Bactris pertencentes ao banco *in vivo* (*ex situ* para açai e pupunha e *in situ* e *ex situ* para juçara) de germoplasma mantido pelo IAC em suas Estações Experimentais. As palmeiras foram cortadas na base e coletado o tecido jovem do palmito da região de diferenciação (figura 1), o mesmo usado nas determinações de atividade de PPO. Este material foi dividido em duas partes: uma reservada

para dosagem de PPO e outra para fenóis. Após a pesagem, o material para PPO foi congelado imediatamente em N₂ líquido e reservado em freezer, e o de fenóis colocado em tubo de ensaio com tampa rosqueável, contendo etanol absoluto a 60°C. O material de fenóis foi mantido em banho-maria a 60°C por 1 h com agitação ocasional, resfriado no ambiente, centrifugado e reservado para as dosagens.

As determinações de fenóis solúveis totais foram feitas com o reagente de Folin Ciocalteau (Swain & Hillis, 1959). CGA foi determinado em HPLC, utilizando-se uma coluna de fase reversa (C₁₈ Supelco Microsorb, 4mm x 250mm, 5 µm) em $\lambda = 313$ nm. A separação foi feita com um gradiente de 45 min, de 0 a 100 % de metanol em solução aquosa de ácido acético 0,5 % (Mazzafera, 1997; Sartor & Mazzafera, 2000). A concentração de CGA foi determinada por comparação com quantidades conhecidas de CGA puro (Sigma). Além do tempo de retenção, CGA foi identificado nas amostras por injeção simultânea em HPLC, de quantidades bastante reduzidas do padrão com os extratos. Para se obter um perfil dos fenóis nestes extratos, a mesma corrida cromatográfica foi realizada com detecção em $\lambda = 254$ nm.

3.4. Determinação da variabilidade na atividade da PPO

Como comentado acima, parte do material proveniente de 30 plantas de cada palmito foi analisada para a atividade da PPO. A extração de proteínas e sua quantificação seguiram exatamente os mesmos procedimentos descritos anteriormente no item 3.2.

3.5. “Tissue printing” de caules e reação para PPO

Algumas palmeiras tiveram o caule cortado e usado para impressionar uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), que possui alta afinidade a proteínas. A membrana foi previamente umedecida em metanol 20 % e depois em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0.

A membrana foi colocada sobre uma base de borracha e nela pressionado o caule, sendo lavada rapidamente com o tampão e transferida para uma solução de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0 contendo CGA 2 mM e *p*-fenilenodiamino 1 mM. Assim que houve o desenvolvimento de cor a membrana foi seca em temperatura ambiente.

3.6. Manipulação de ácidos nucleicos

3.6.1. Extração de RNA total, síntese de cDNA e reações de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase

O RNA total do palmito foi extraído de acordo com Dry & Robinson (1994), e a primeira fita de cDNA produzida com kit da Boehringer Mannheim – “1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)” e o primer B26 (Frohmann *et al.*, 1989). Reações de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram feitas com esses cDNAs usando primers degenerados de oligonucleotídeos (Thygesen *et al.*, 1995). Estes primers vêm sendo usados com sucesso em várias culturas como banana, alface, batata, morango, cenoura, uva, abacaxi, etc. A RT-PCR foi feita da combinação de primers em sentido sense (GEN3, GEN4, GEN5, GEN6, GEN7, GEN8, GEN9 e GEN10) com os primers antisense (REV1, REV2, REV3 e REV4) como mostra a figura 2, com a posição relativa dos primers usados no RT-PCR com a seguinte programação do termociclador:

- 2 ciclos (94°C por 2 min; 37°C por 2 min; rampa até 72°C em 2 min e manutenção por mais 2 min na mesma temperatura);
- 28 ciclos (94°C por 2 min; 56°C por 2 min; 72°C por 2 min);
- manutenção a 72°C por 7 min;
- manutenção a 4°C.

Após a amplificação pelo RT-PCR, o material foi observado em gel de agarose 1 % revelado sob luz UV.

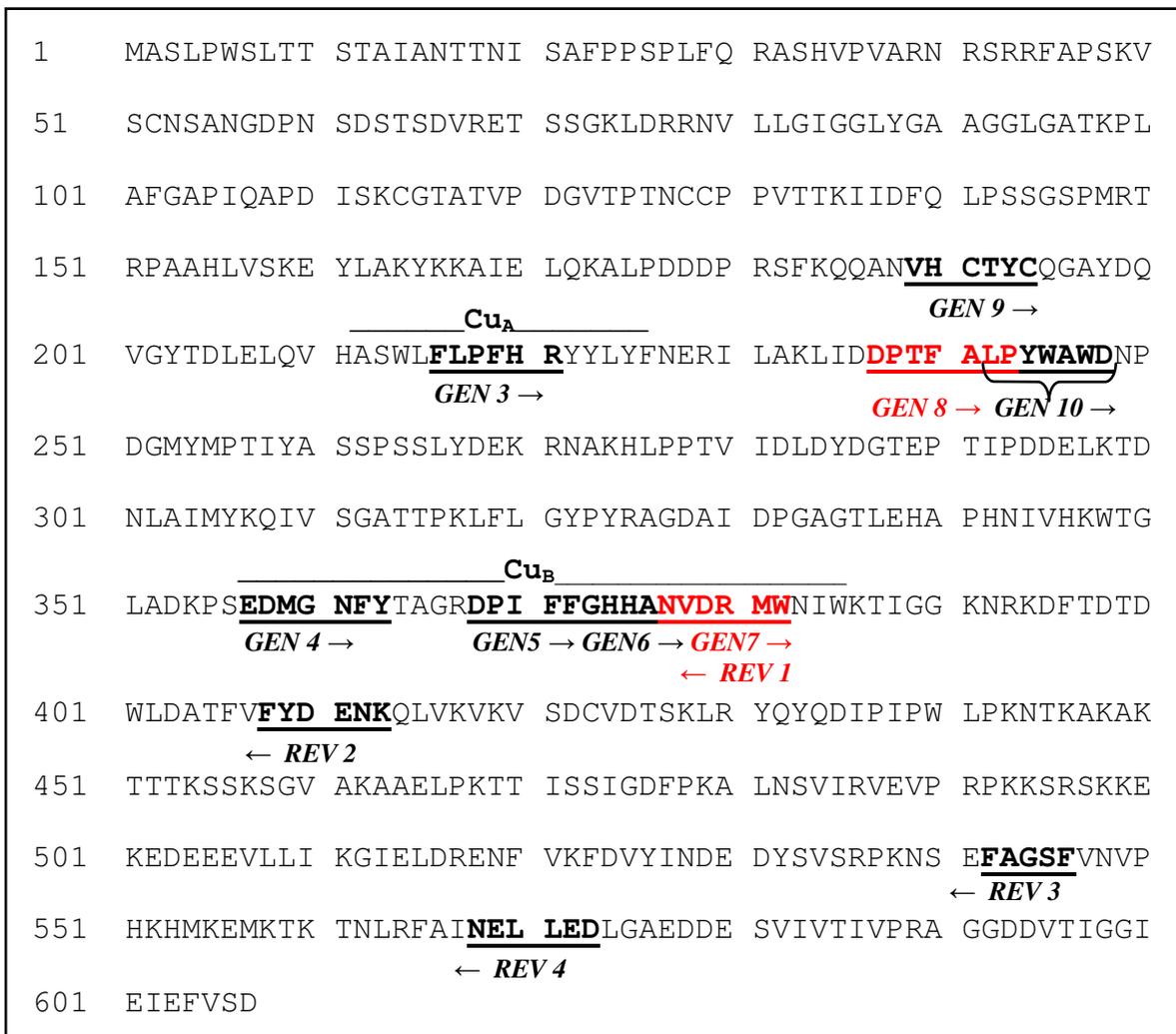


Figura 2: Sequência de polifenoloxidase de uva com a posição dos primers sense e antisense usados nas reações de RT-PCR do palmito.

3.6.2. Clonagem de fragmentos e seqüenciamento

Após separação em gel de agarose, as bandas mais intensas e correspondendo ao número de bases estimado (com base nas seqüências de outras PPO já descritas na literatura) foram purificadas, extraídos com kit da Roche (Agarose gel DNA extraction kit), inseridos em vetor da Promega (pGEM®-T Easy Vector Systems) e clonados em *E. coli* DH5- α por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). As bactérias transformantes foram selecionadas em meio de cultura LB seletivo, sem sacarose e contendo ampicilina, isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

(IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-gal) (Sambrook *et al.*, 1989), e repicadas em meio sólido e sujeitas a um “miniprep” para certificação de que as colônias selecionadas apresentavam o inserto (Sambrook *et al.* 1989). Este foi digerido com a enzima de restrição EcoR I, que flanqueia o ponto de inserção do fragmento nos plasmídeo p-Gem Easy Vector, e aplicado em eletroforese de agarose 1 %, tendo como controle o fragmento isolado inicialmente do gel de RT-PCR. Foram estabelecidas novas culturas em meio líquido, nos casos positivos para a presença do fragmento, para purificação do plasmídeo por “maxiprep” (Sambrook *et al.*, 1989) e sequenciamento do inserto nos dois sentidos, utilizando como primers de sequenciamento as regiões conhecidas flanqueando o fragmento (primers SP6 e T7, Promega). Para a reação de sequenciamento, realizado no Hemocentro da Unicamp, utilizou-se o kit Big-Dye (Applied Biosystems), em seqüenciador MegaBace da Amershan-Pharmacia. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.6.3. Análises do Número de Genes (Southern) e de Expressão (Northern)

Para a verificação do número de genes de PPO presentes nas plantas (Southern blot) foram produzidas duas sondas radioativas em uma reação contendo tampão e fragmento Klenow, os fragmentos inteiros identificados como de PPO [PPOEd17 (juçara) e PPOAc45 (açai)], PdN6, desoxirribonucleotídeos (exceto CTP), e [³²P]dCTP, em um volume final de 20 μ L, que foram colocados em banho seco à 37°C por 1 h. A extração do DNA genômico das plantas foi feita a partir das folhas (Stewart & Via, 1993) e a digestão feita com as enzimas de restrição Hind III e Dra I. Os DNAs digeridos foram separados em gel de agarose 1,2 % e a transferência para a membrana de hibridização Hydond N+ (Amershan-Pharmacia), pré-hibridização e hibridização feita de acordo com Moore (1987). A lavagem da membrana foi

feita por duas vezes em temperatura ambiente e uma terceira vez a 65°C. Em seguida a membrana foi revelada no aparelho Cyclone Image Analyser (Packard)

Para verificação da expressão gênica (Northern blot) RNA total foi extraído de palmito (Dry & Robinson, 1994), seguido de separação em gel de agarose 1,2 % com formamida. O RNA foi transferido para uma membrana Hybond N+, incubada por 2 h a 42°C com solução de pré-hibridização, seguida da hibridização com a sonda PPOEd17 ou PPOAc45 (Moore, 1987).

A expressão gênica da PPO em diferentes tecidos foi feita por RT-PCR, por apresentar maior sensibilidade. Para tal, quantidades semelhantes de RNA total, aferidas por leitura em espectrofotômetro a $\lambda = 260$ nm e também por comparação em gel de agarose (1 %), foram usadas na síntese da primeira fita de cDNA. O RT-PCR desse material foi feito inicialmente com primers desenhados para ubiquitina, para calibração da quantidade de cDNA a ser incluída na RT-PCR, e, após aferição, a RT-PCR feita de acordo com o protocolo anterior, mas diminuindo-se o número de ciclos para apenas 20 e os tempos dos ciclos em 1 min. Os produtos das RT-PCR's foram separados em gel de agarose 1 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização de PPO dos palmitos juçara, açazeiro e pupunheira

Para testar se a PPO de palmito tinha sua atividade aumentada por SDS, uma característica comum à enzima de várias plantas (Steffens *et al.*, 1994; Friedman, 1997, Jukanti *et al.*, 2003), as reações foram conduzidas com este detergente presente em várias concentrações finais (figura 3). Os dados abaixo mostram inibição da atividade de PPO nos resultados com extrato de juçara. Sendo assim, o SDS foi excluído do meio de reação nos outros ensaios.

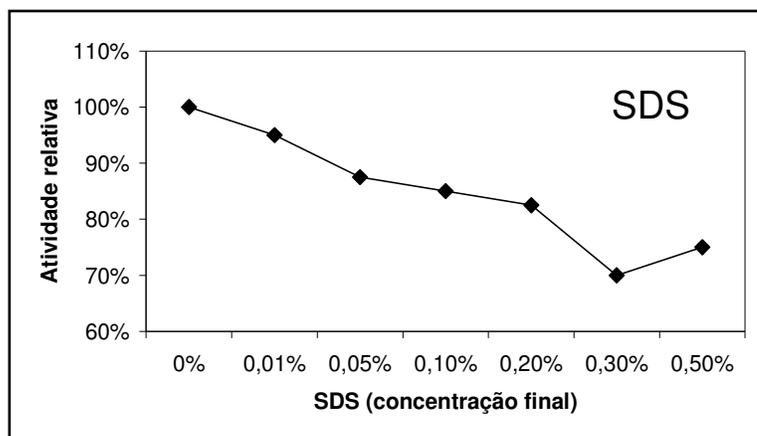


Figura 3. Atividade da polifenoloxidase de palmito de juçara na presença de SDS.

A figura 4 mostra os resultados dos testes de substratos com extratos de palmito de juçara, açazeiro e pupunheira. Os dados são expressos percentualmente em relação ao substrato que conferiu maior atividade, o CGA, que passou a ser usado em todas as dosagens posteriores. CGA também foi verificado por outros autores como sendo o melhor substrato para palmito de juçara (Lourenço *et al.*, 1990) e o da palmeira *A. rubra* (Robert *et al.*, 1996).

Curiosamente foi observada boa atividade também com dopamina e catequina, que têm

sido considerados bons substratos para banana (Yang *et al.*, 2000) e folhas de chá (Halder *et al.*, 1998), respectivamente.

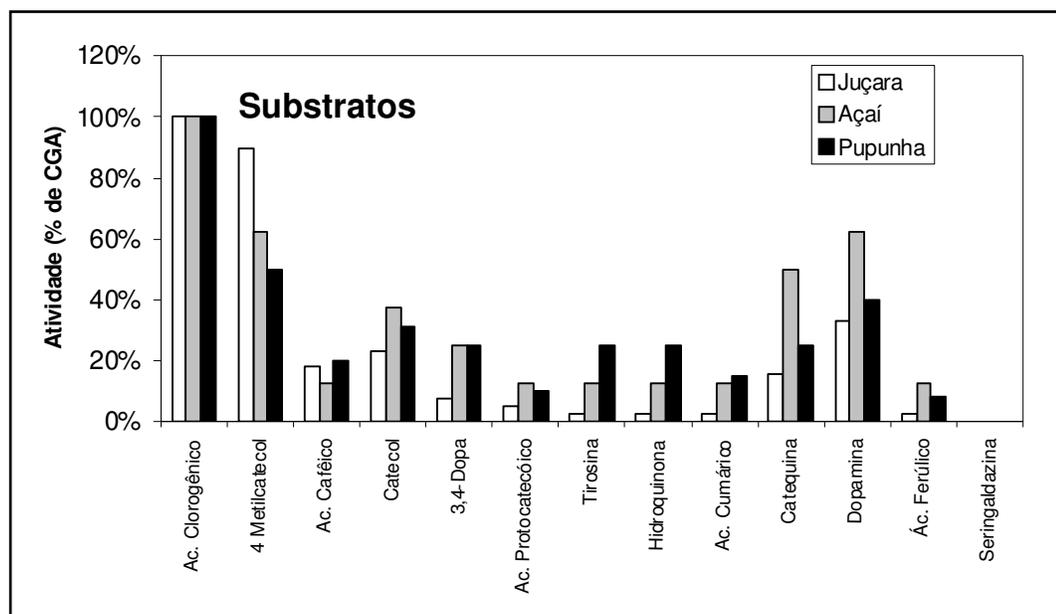


Figura 4. Atividade da polifenoloxidase em palmito de juçara, açazeiro e pupunheira contra vários substratos.

O comportamento das PPOs de palmito das três palmeiras foi testado contra vários inibidores conhecidos (Figura 5). Os dados são apresentados em porcentagem da atividade sem a presença de inibidores. PPO de açazeiro foi menos afetada por ácido salicilhidroxâmico (SOH), conhecido como inibidor de PPOs, mas não de lacases. PPOs oxidam *o*-difenois e lacases, *p*-difenois. O palmito da pupunheira apresentou menos de 30 % da atividade inicial já com a menor concentração deste inibidor. Para brometo de cetiltrimetilamônia (CTAB) as enzimas não tiveram suas atividades afetadas de modo muito diferente, exceto na pupunheira, apresentou valores um pouco inferiores. CTAB tem mostrado ser inibidor de PPOs (Robinson *et al.*, 1993; Mazzafera & Robinson, 2000), mas também inibe lacase (Walker *et al.*, 1980). Tropoleno, um efetivo inibidor de PPOs que se acopla aos sítios de Cu da enzima (Sojo *et al.*, 1998a) também foi bastante efetivo para as três PPOs das palmeiras, pois inibiu desde a

concentração mais baixa. Os níveis de inibição a 10 μM para duas das palmeiras, açaí e pupunha, foram semelhantes aos observados para SOH a 20 μM .

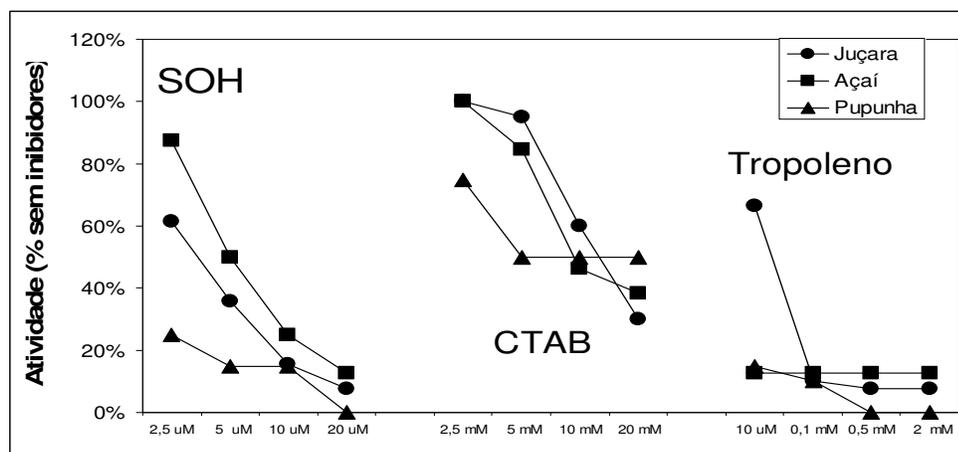


Figura 5. Efeito de inibidores na atividade de PPOs de palmito de juçara, açaizeiro e pupunheira.

Foi determinado o K_i para PPO em extratos de palmito do açaizeiro e de juçara utilizando-se os inibidores SOH e tropoleno, que se mostraram mais efetivos. CGA foi usado como substrato. Não foi feita a determinação do K_i para PPO de pupunha, pois a enzima apresentou atividade muito reduzida quando ensaiada com baixas concentrações de CGA e na presença dos inibidores. A figura 6 mostra os gráficos de Lineweaver-Burk obtidos para os inibidores. A constante de dissociação obtida para o inibidor tropoleno foi menor do que a obtida para SOH com PPO de açaí, enquanto que para a PPO de juçara ocorre o inverso, pois SOH apresenta um K_i bem menor comparado ao tropoleno, sendo o inibidor mais efetivo para juçara. Sojo *et al.* (1998b) observaram um K_i de 46 μM para tropoleno com PPO purificada de banana, enquanto que em palmito encontramos um K_i de 1,25 μM para açaí e 6,55 μM para juçara para esse inibidor. Em ambos os casos a inibição foi do tipo competitiva, logo reversível. Isto indica que o inibidor se acopla no mesmo sítio de ligação do CGA.

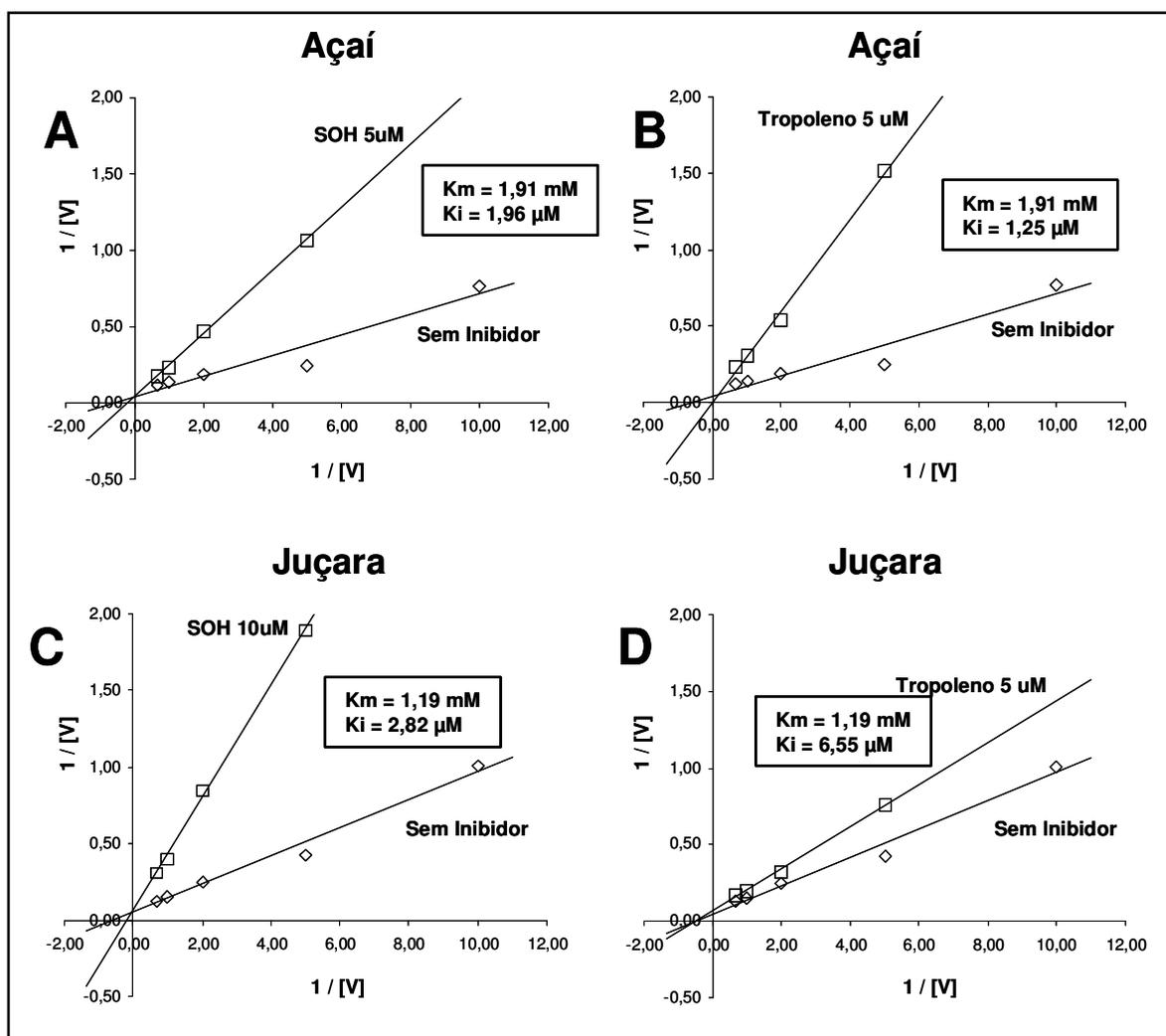


Figura 6. Plots de Lineweaver-Burk obtidos para extratos de PPO das palmeiras açai (A e B) e juçara (C e D), na presença ou não dos inibidores SOH (A e C) e tropoleno (B e D).

A figura 7 mostra os resultados de dois ensaios para definição do melhor pH de reação para PPO. No primeiro ensaio (figura 7 A), os resultados foram muito semelhantes para as PPOs do palmito das três palmeiras, sendo o pH 6,0 o que apresentou a melhor atividade, mas também com boa atividade em 5 e 7.

Na maioria dos casos da literatura, esta faixa de pH tem sido a de melhor atividade. No segundo ensaio (figura 7B) foi avaliado o pH ótimo no meio de reação em intervalos de 0,5 unidade de pH para a PPO de juçara e açai. Novamente o pH 6,0 apresentou a melhor atividade para PPO de palmito.

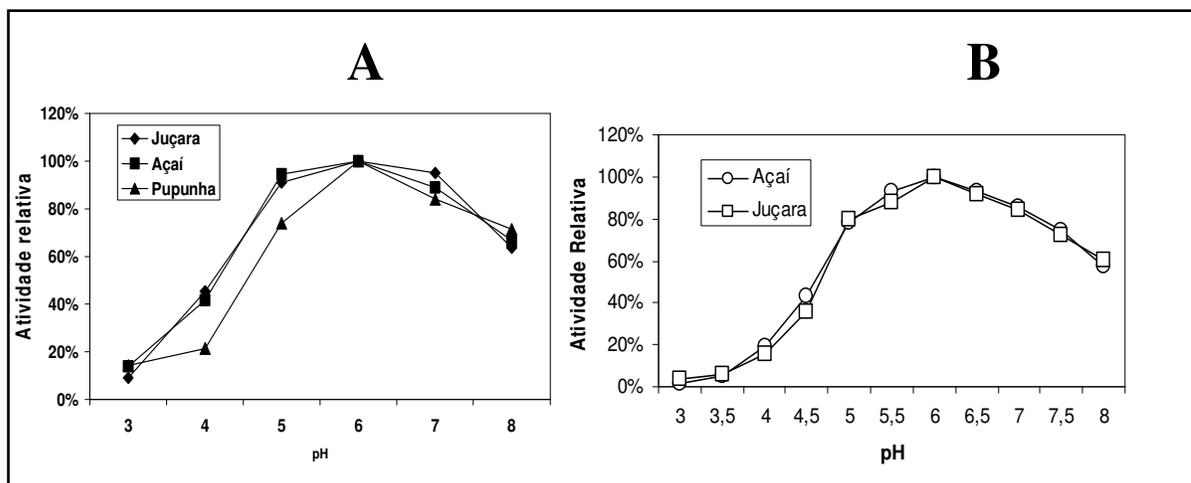


Figura 7. Definição do melhor pH, em intervalos de 0,5 unidade, para atividade de PPO em palmito de juçara e açazeiro (B).

A figura 8 mostra resultados do ensaio para definição da melhor temperatura no meio de reação. Com exceção de juçara que mostrou melhor atividade a 30°C, pupunha e açai tiveram melhor atividade em 25°C.

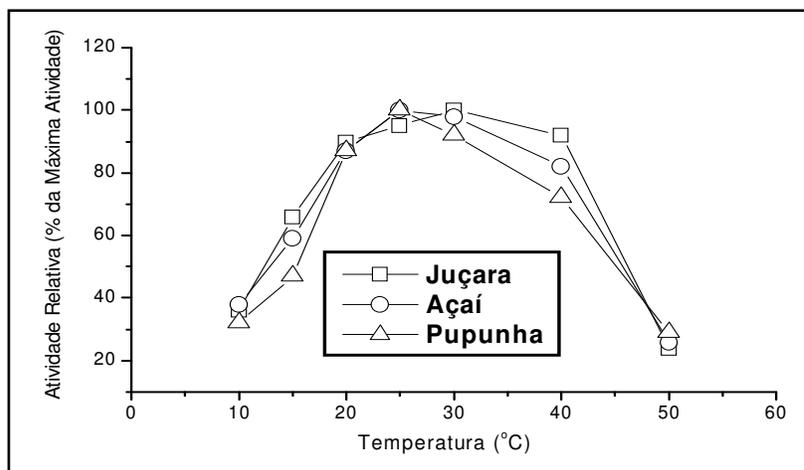


Figura 8. Definição da melhor temperatura para atividade de PPO em palmito de juçara, açazeiro e pupunheira.

A figura 9 mostra os dados sobre a termoestabilidade da PPO das três palmeiras. As PPOs de palmito de juçara e açazeiro tiveram comportamentos bastante semelhantes. É interessante notar que mesmo após 15 min a 90°C a atividade de PPO nestas duas palmeiras

era 10 % da inicial. Com 50°C, 70 % da atividade ainda estava presente após 45 min, mostrando serem as PPOs destas palmeiras bastante estáveis termicamente. Por outro lado, PPO da pupunheira mostrou-se mais sensível do que as outras palmeiras.

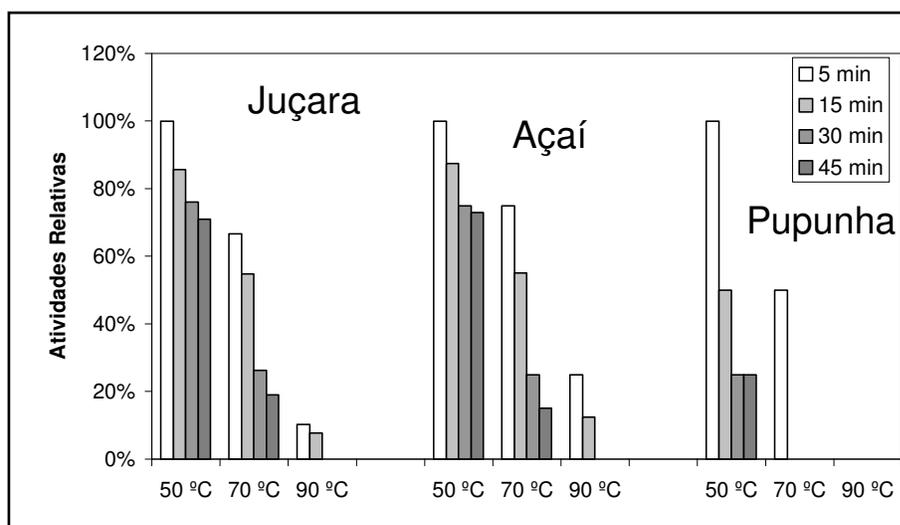


Figura 9. Estabilidade térmica de PPO de juçara, açazeiro e pupunheira.

Esta estabilidade foi maior do que a verificada por outros autores para outras palmeiras. A PPO de *A. rubra*, por exemplo, mostrou ser estável a 30°C (Robert *et al.*, 1996) verificaram que 1 h. Porém, neste caso, os resultados são bastante concordantes com aqueles de Lourenço *et al.* (1990) para PPO de palmito de juçara. Estes autores observaram que, por exemplo, com 75°C, a enzima de palmito de juçara não apresentava atividade após 20 min. Porém, com 70°C, a atividade após 30 min era próxima a 25 % da inicial, como observado aqui. A 50°C, a atividade permaneceu em 80 % da inicial. Assim como os de Lourenço *et al.* (1990), estes dados são, de certa forma, discordantes daqueles de Silva e Nogueira (1983). Estes autores observaram 100 % de inativação de PPO após imersão do palmito em banho a 90°C por 2 min. Após este período com 50°C a perda da atividade era de 50 %. Entretanto, estes dados têm que ser vistos com cautela, pois Silva e Nogueira (1983) usaram o palmito inteiro e depois tiveram

sua atividade determinada, enquanto neste caso o ensaio foi realizado diretamente com o extrato protéico.

Foi determinado o Km para as enzimas dos palmitos de juçara, açazeiro e pupunheira usando-se CGA como substrato. Como mostra a tabela 1, juçara e açazeiro têm menor afinidade pelo substrato (maior Km) do que pupunheira. Comparativamente a outras enzimas, PPOs tem Km alto (Whitaker, 1995), ou seja próximo ou acima de 1 mM, sendo que aqui isto foi observado para juçara e açazeiro. O Km baixo da pupunheira talvez esteja relacionado à sua baixa quantidade nos tecidos desta palmeira, pois a baixa concentração da enzima pode ser compensada pela sua maior eficiência na presença de baixas concentrações de substrato. A Km nas raízes e folhas novas das 3 palmeiras, de modo geral, foram semelhantes aos dos palmitos.

Tabela 1. Km da PPO das palmeiras juçara, açazeiro e pupunheira

	Km (mM CGA)		
	Juçara	Açazeiro	Pupunheira
Palmito	1,190	1,910	0,530
Raiz	0,842	0,984	0,621
Folha nova	1,015	1.250	0,753

A tabela 2 mostra as atividades de PPO em folhas, raízes e palmito de açazeiro, pupunheira e juçara. Os dados foram apresentados como atividade por quantidade de material extraído. A indicação de folhas mais novas ou velhas na tabela 2 correspondem à primeira e quinta folhas. Destas foram usadas os folíolos posicionados no meio da folha. Observa-se que houve grande variação entre as plantas, mesmo tendo sido usadas mudas com idades semelhantes. Dentro de plantas, houve maior atividade no palmito que nas demais partes analisadas.

A atividade de PPO no palmito foi particularmente elevada para a juçara e o açazeiro,

sendo 69 e 40 vezes superiores, respectivamente, à encontrada em pupunheiras.

Tabela 2. Atividades de PPO (por massa de material extraído) em folhas novas e velhas, palmito e raízes de quatro plantas.

		Atividade Específica de PPO (nmoles de O₂ . g massa fresca⁻¹ . min⁻¹)					
		Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Médias	Desv. Padrão
Juçara	Folha Nova	34,1	105,9	18,8	28,1	46,7	40,0
	Folha Velha	37,5	42,3	20,1	26,3	31,5	10,1
	Palmito	363,6	442,1	307,7	950,5	516,0	294,9
	Raiz	15,3	24,4	12,2	25,0	19,2	6,4
Açaizeiro	Folha Nova	137,6	49,6	69,4	84,7	85,3	37,7
	Folha Velha	63,6	71,3	29,8	35,7	50,1	20,4
	Palmito	92,7	453,3	367,3	277,6	297,7	154,4
	Raiz	42,1	49,7	48,0	32,0	42,9	8,0
Pupunheira	Folha Nova	1,76	1,58	1,00	5,77	2,5	2,2
	Folha Velha	4,41	0,88	0,00	0,00	1,3	2,1
	Palmito	3,97	13,33	4,00	8,45	7,4	4,5
	Raiz	2,11	0,00	2,73	0,00	1,2	1,4

De modo geral a atividade em folhas novas foi maior do que folhas velhas, o que era esperado, como tem sido mostrado na literatura (Rathjen & Robinson, 1992; Bucheli *et al.*, 1996; Constabel *et al.*, 1996; Mazzafera & Robinson, 2000). Entretanto, a atividade em raízes não foi muito menor do que em folhas. São praticamente inexistentes os dados de PPO em raízes, e os poucos publicados, são baseados em método colorimétrico, não permitindo comparação com os apresentados aqui, em consumo de O₂. Em cafeeiro, a atividade em raízes fica na faixa de 8 a 10 nmoles de O₂/g.min, sendo este valor em média 8 vezes menor do que nas folhas novas. (Mazzafera, dados não publicados).

Confirmando o que se conhece em pupunheira (Ferreira *et al.*, 1982), a sua atividade de PPO é bastante reduzida quando comparada à juçara e ao açaizeiro, razão pela qual os

palmitos das últimas duas espécies apresentam rápido escurecimento logo após o corte, enquanto o de pupunheira permanece com coloração praticamente inalterada. A dispersão dos dados encontrados, entre e dentro de todas as espécies aqui analisadas, sugere a ocorrência de grande variabilidade nesse caráter e a possibilidade de seleção.

A tabela 3 mostra a atividade específica de PPO. É muito interessante observar que aqui, atividades menores de PPO em juçara e açazeiro foram observadas no palmito. Esta observação indica que proporcionalmente a outras proteínas, ou PPO está sendo pouco expressa, ou a meia vida da proteína é curta. O contrário pode ser dito nas outras palmeiras, sendo que na pupunheira isto é bastante evidente. Quando feitas comparações em um mesmo órgão, por exemplo folhas, a razão disto é bastante clara. Em cafeeiro e videira, a atividade expressa por quantidade de material extraído é maior em folhas novas do que velhas. Entretanto, calculando-se por proteína, à medida que a idade da folha avança, a atividade é maior. Isto ocorre porque tecidos novos têm alta taxa de biossíntese de proteínas, “diluído” a atividade da PPO quando expressa pela quantidade de proteína. Uma vez que PPOs são bastante estáveis (longa meia vida), e o teor de proteínas diminui, a atividade específica nas folhas velhas é maior. Se calculada a atividade total na folha, e não por massa, veremos que a atividade é bastante semelhante nas folhas novas e velhas. Ou seja, mais uma evidência da meia vida longa de PPOs (Rathjen & Robinson, 1992; Mazzafera & Robinson, 2000). Esta inversão de atividade de acordo com o teor de proteínas foi observada aqui para folhas.

Em raízes de cafeeiro, observou-se algo semelhante quando elas foram classificadas em diferentes estádios de desenvolvimento (Mazzafera, dados não publicados). Raízes normalmente têm baixa concentração de proteínas e isto talvez explique as maiores atividades nestas que no palmito.

Tabela 3. Atividade específica de PPO em folhas novas e velhas, palmito e raízes.

		Atividade Específica de PPO (nmoles de O ₂ . mg proteína ⁻¹ . min ⁻¹)					
		Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Médias	SD
Juçara	Folha Nova	15,8	22,5	42,9	16,0	24,3	12,8
	Folha Velha	5,3	60,0	50,0	13,8	32,3	26,8
	Palmito	8,3	10,7	9,5	21,1	12,4	5,9
	Raiz	30,	40,0	24,0	28,8	30,7	6,7
Açaizeiro	Folha Nova	54,55	188,57	63,16	46,96	88,3	67,2
	Folha Velha	192,00	120,00	60,00	40,00	103,0	68,4
	Palmito	5,96	17,01	12,10	9,89	11,2	4,6
	Raiz	120,00	54,00	180,00	60,00	103,5	59,1
Pupunheira	Folha Nova	0,20	0,17	0,10	0,75	0,31	0,30
	Folha Velha	0,39	0,12	0,00	0,00	0,13	0,19
	Palmito	0,21	3,14	0,46	0,55	1,09	1,37
	Raiz	0,74	0,00	1,33	0,00	0,52	0,64

4.2. Compostos fenólicos e PPO

Os resultados deste ensaio (tabela 4) mostram que a atividade de PPO segue a descrita na literatura para palmito (Ferreira *et al.*, 1982a,b), ou seja, a atividade em pupunha é bem inferior àquelas encontradas em açaí e juçara. Foram analisadas 30 plantas de cada palmeira e o desvio padrão manteve-se ao redor de 10 %.

Foi determinado em ensaio anterior que entre 13 substratos testados para a atividade da PPO de palmito, CGA era o melhor, seguido por 4-metilcatecol, um fenol não encontrado em plantas. As análises de CGA foram feitas em HPLC com detecção em $\lambda = 313$ nm. Pelos dados da tabela 4 é interessante notar que a palmeira pupunha tem em seu palmito a menor quantidade de CGA, apesar de ter o conteúdo de fenóis solúveis semelhante ao de açaí. Portanto, inicialmente seria possível especular que o menor teor de CGA poderia contribuir

para o menor escurecimento do palmito da pupunheira.

Tabela 4. Conteúdo de fenóis, CGA, proteínas e atividade de PPO no palmito das palmeiras juçara, açaí e pupunheira e respectivo desvio padrão.

Palmito	Fenol total (mg/g MF)	Ac. clorogênico (mg/g MF)	Proteína solúvel (mg/g MF)	PPO	
				Atividade específica (nmoles O ₂ /mg prot.min)	Atividade relativa (nmoles O ₂ /g MF.min)
Juçara	1,12 ± 0,12	0,147 ± 0,026	2,74 ± 0,37	22,2 ± 4,2	80,6 ± 7,8
Açaí	2,41 ± 0,12	0,168 ± 0,026	1,46 ± 0,18	38,8 ± 6,6	83,2 ± 9,1
Pupunha	2,31 ± 0,34	0,017 ± 0,004	0,89 ± 0,09	8,61 ± 0,86	10,2 ± 1,4

MF = Massa fresca

Os cromatogramas em HPLC (perfil cromatográfico com detecção em $\lambda = 254$ nm) dos extratos etanólicos dos palmitos (figura 10) mostram as diferenças entre eles, principalmente entre juçara e açaí com a pupunha. De cada amostra foram injetados 50 μ l, o que corresponde em média a 5,2 μ g de fenóis totais nos extratos de pupunha, 8 μ g nos de juçara e 2,3 μ g nos de açaí. Pupunha apresentou uma variedade maior de compostos absorvendo em 254 nm. Por estes cromatogramas é evidente que apesar de ter menos fenóis que as outras palmeiras (tabela 4), a pupunha parece ter maior variedade desses compostos. Desta forma, a menor oxidação no palmito dessa palmeira não poderia ser exclusivamente devido à pequena quantidade de CGA (o principal substrato), mas também pela inabilidade de oxidar eficientemente os outros fenóis presentes. Por outro lado, os valores de fenóis totais em juçara e açaí são explicados pela presença de alguns fenóis em grande quantidade (observar que a escala de açaí e juçara estão em V, enquanto que a de pupunha está em mV).

Iaderoza & Draetta (1982) estudaram um pigmento rosa que é formado durante o armazenamento de palmito juçara, mesmo após o mesmo ter sido processado industrialmente, ou seja, ter sofrido tratamento térmico e embalado sob vácuo. Neste estudo, elas conseguiram identificar três substâncias (leucoantocianidina, catequina e pirogalol). Usando extrato protéico

de palmito (fonte de PPO) como revelador, ou seja, esta solução foi aspergida sobre cromatogramas de papel nos quais foram separados os extratos etanólicos de palmito, verificou-se o desenvolvimento de coloração rósea para a leucoantocianidina e marrom para catequina e pirogalol. Não foi relatada no trabalho a detecção de CGA, provavelmente pelo fato de que o método usado (cromatografia de papel) não tem a precisão, sensibilidade e resolução de um cromatógrafo líquido.

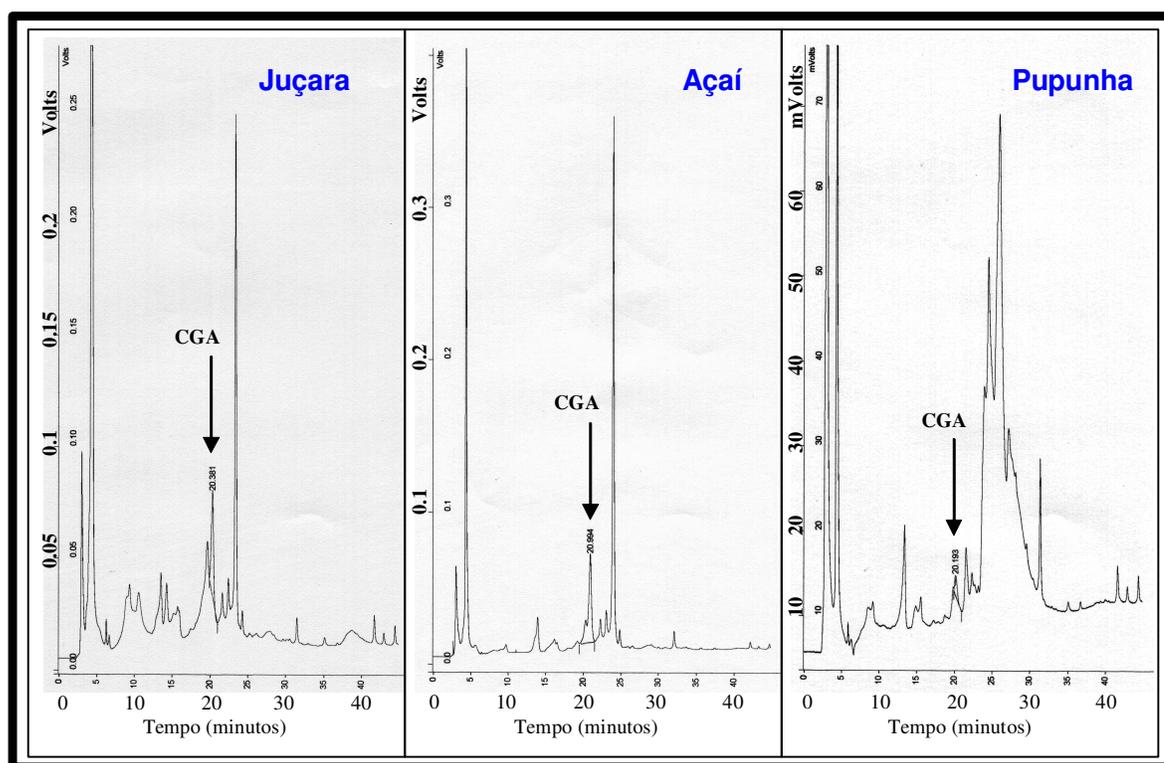


Figura 10. Perfil cromatográfico de extratos etanólicos de palmito de juçara, açai e pupunha, com indicação do CGA (detecção em 254 nm).

Observando os cromatogramas apresentados na figura 10, poder-se-ia inferir que algum dos outros picos poderia ser, por exemplo, catequina, e que CGA não estaria de fato ligado à cor marrom desenvolvida no palmito cru. Porém, Lourenço *et al.* (1990) verificaram os seguintes valores de K_m para alguns compostos: CGA $K_m = 0,57$ mM; ácido caféico $K_m = 0,59$ mM; catecol $K_m = 1,1$ mM; 4-metilcatecol $K_m = 2,0$ mM; catequina $K_m = 6,25$ mM.

Para verificar a possibilidade de que a composição qualitativa de fenóis poderia ser um fator determinante na menor oxidação da pupunha, cortes de caule foram feitos e pressionados sobre membranas PVDF, para retenção das proteínas (“*Tissue printing*”). Foram incubadas em seguida com CGA, confirmado anteriormente como o melhor substrato para as três palmeiras (figura 11).

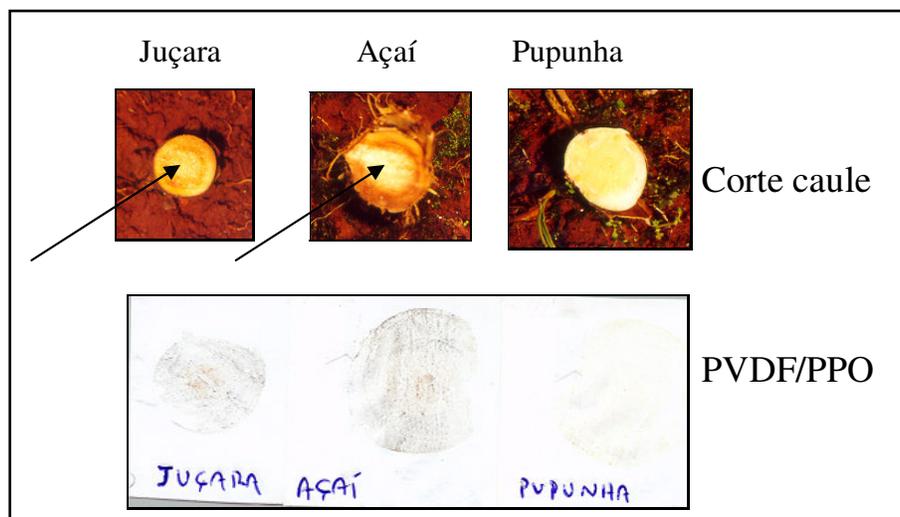


Figura 11. Fotos mostrando os pontos de cortes de caule de palmeiras após 1 h do corte e as membranas de PVDF impressadas com fatias de caule proveniente das mesmas plantas

Observando a figura 11, é bastante evidente que não ocorre oxidação na pupunha e que isto não seria devido à ausência de CGA ou mesmo que outros fenóis não seriam eficientes como substratos. Outro aspecto curioso é o fato de que o escurecimento nos cortes de juçara e açai ocorreu principalmente nas bordas dos tecidos, mas as membranas mostram escurecimento por inteiro, portanto, havendo a presença de PPO. Este fato não foi investigado, mas seria de se supor que à medida que se caminha do centro para as bordas do caule existe a presença de tecidos clorofilados e, conseqüentemente, de maior quantidade de fenóis. Isto ocorre porque a biossíntese dessas substâncias é dependente de luz. A enzima fenilalanina amônia-liase, a enzima chave do metabolismo de fenóis e que converte fenilalanina em ácido

cinâmico, o primeiro fenilpropanóide formado em células vegetais, é dependente de luz (Dixon & Paiva, 1995; Dixon *et al.*, 1996).

Deixando de comparar o papel da quantidade de fenóis da pupunha com as outras palmeiras, e partindo para um mesmo palmito chegamos a conclusão de que a oxidação não é maior em juçara e açáí pelo fato de que a parte que constitui o palmito não apresenta grandes quantidades de fenóis. A figura 12 mostra a fatia do caule de um palmiteiro adulto (juçara) em comparação com um corte de caule de pupunheira, onde isto é bastante claro. Na figura 11, por ainda serem plantas muito jovens e, portanto, tendo pouco palmito, isto não é tão evidente como na foto da figura 12, com palmito de plantas de aproximadamente 5 anos de idade.

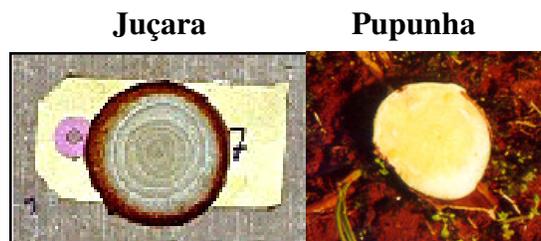


Figura 12. Fatias do caule de palmiteiros com aproximadamente 5 anos de idade após 1 h do corte mostrando ausência de oxidação em pupunheira e intensa oxidação de fenóis nas bordas do caule de juçara.

4.3. Isolamento de clones de PPO

Nos estudos moleculares, RNA total foi extraído do palmito (somente a parte imediatamente após o meristema) do juçara, açazeiro e pupunheira. De cada palmeira (foram usadas duas), foi retirado um total de aproximadamente 1 g de palmito para a extração de RNA total utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA, que foi utilizado para amplificação de seqüências, usando primers na direção sense e anti-sense. As reações de RT-PCR foram então separadas em eletroforese de agarose 1 % e os fragmentos formados, visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio. As combinações de primers usadas e aquelas que geraram fragmentos são mostradas na tabela 5.

Exceto a combinação Gen 3/Rev 2, juçara e açazeiro apresentaram fragmentos amplificados semelhantes em três outras combinações, ou seja, Gen 10/Rev 1, Gen 7/Rev 2 e Gen 9/Rev 2. Isto não permite afirmar que os fragmentos são de PPOs semelhantes, sendo o seqüenciamento destas amplificações necessárias para sua confirmação, já que alguns destes fragmentos podem não ser de PPO, existindo outros mRNAs presentes no RNA total extraído que podem reconhecer inespecificamente os primers.

Tabela 5. Combinação de primers usados no RT-PCR com cDNA de palmito de juçara, açazeiro e pupunheira. O * indica as combinações com amplificação.

cDNA	Primer “Antisense”	Primer “Sense”							
		Gen 3	Gen 4	Gen 5	Gen 6	Gen 7	Gen 8	Gen 9	Gen 10
Juçara	REV 1								***
	REV 2					***		***	
	REV 3								
	REV 4								
Açazeiro	REV 1								***
	REV 2	***				***		***	
	REV 3								
	REV 4								
Pupunheira	REV 1	***							***
	REV 2								
	REV 3								
	REV 4								

Pupunheira apresentou apenas uma combinação comum às outras duas palmeiras, Gen 10/Rev 1. Vale a pena salientar aqui que as bandas observadas nos RT-PCRs de todas as palmeiras eram muito fracas, ou seja, houve pouca amplificação. Isto poderia estar relacionado, assim, com a quantidade de mRNAs específicos a PPOs nestes materiais. Tanto que para recuperação dos fragmentos produzidos para posterior clonagem, usamos material de um RT-PCR para outra reação de PCR, ou seja, substituiu-se o cDNA na reação. Com esta estratégia foram isolados dois fragmentos para juçara e açai e nenhum para pupunha. Para

pupunha foram repetidos vários RT-PCR's, sem resultados positivos. Os dois fragmentos de juçara, após seqüenciados eram iguais, o mesmo ocorrendo com o de açai. As seqüências são mostradas na figura 13. Os fragmentos de PPO foram nomeados PPOEd17, de juçara, e PPOAc45, de açai.

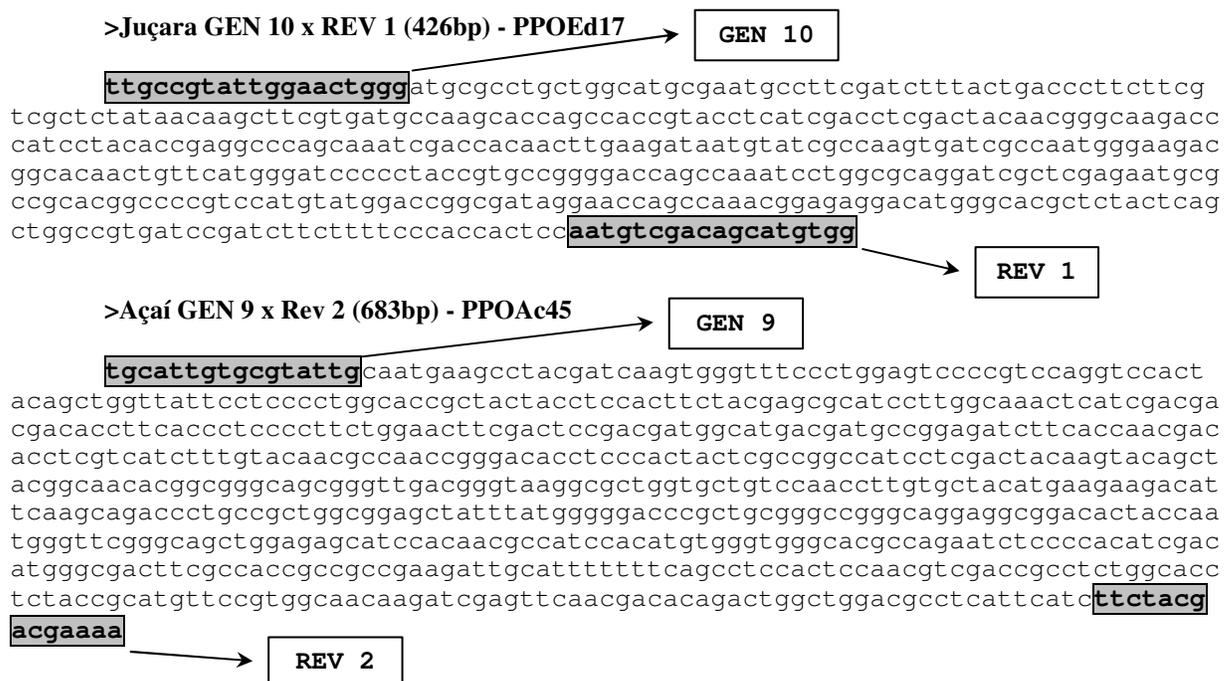


Figura 13. Sequências de PPO de juçara (PPOEd17) e açai (PPOAc45), com indicação dos primers sense e antisense usados

As duas seqüências de nucleotídeos obtidas foram comparadas, apresentando apenas 40,1 % de similaridade (Pearson *et al.*, 1997), como mostra a figura 14. Quando convertidos em aminoácidos e comparados, essa similaridade cai para 24,1 % (figura 15). São indicados nessa figura os sítios de ligação de cobre, que apresentam histidinas, responsáveis pela oxidação dos fenóis, através de redução e oxidação do metal em função do oxigênio. São estes sítios que explicam a necessidade da presença de oxigênio para a atividade de PPO (Mayer & Harel, 1991; Whitaker, 1995). Estas seqüências foram comparadas com seqüências depositadas em banco de dados (NCBI), demonstrando similaridade com várias PPOs,

Figura 14. Similaridade entre PPOEd17 (juçara) e PPOAc45 (açai). Destaque em azul para os sítios de cobre.

Tabela 6. Semelhança dos fragmentos identificados como sendo de genes de PPO com seqüências de PPO de outras plantas.

Palmeira	Fragmento	Semelhança		
		Planta 1	Planta 2	Planta 3
Juçara	PPOEd17	<i>Ananas comosus</i> (88%)	<i>Pyrus pyrifolia</i> (81%)	<i>Malus domestica</i> (81%)
Açai	PPOAc45	<i>Triticum aestivum</i> (74%)	<i>Oryza sativa</i> (73%)	<i>Ananas comosus</i> (74%)

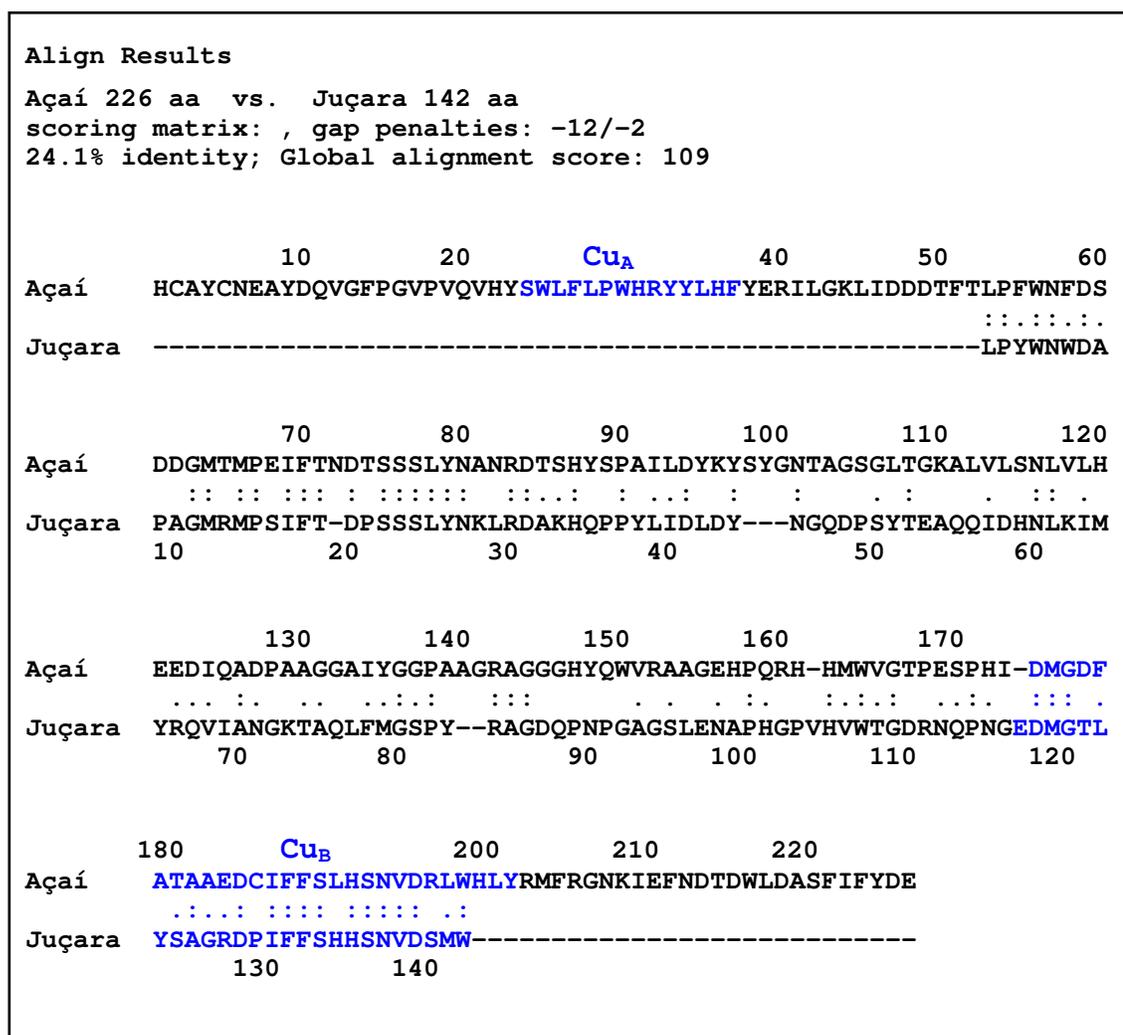


Figura 15. Similaridade entre a seqüência de aminoácidos de PPOEd17 (juçara) e PPOAc45 (açai), com destaque em azul para os sítios de cobre.

Os sítios de ligação de cobre são regiões bastante conservadas em PPOs e por esta

razão é que os primers degenerados desenhados para a realização de RT-PCR foram dessa região. Como citado anteriormente, o fato de ter sido necessária a realização de RT-PCR usando produto de uma reação anterior para aumentar ainda mais a amplificação do sinal pode ser indicativo de um pequeno número de cópias de mRNA específico para PPO. Entretanto, a baixa expressão não necessariamente significa a ausência de genes. Existem trabalhos na literatura mostrando que PPO em algumas espécies pertence a uma família de genes, enquanto que em outras, apenas um gene codifica PPO. Em tomateiro, PPO é codificada por uma família de genes que apresentam expressão diferencial, dependendo do tecido e de tratamentos indutivos, tal como dano mecânico (Thipyapong & Steffens, 1997). Em tabaco ocorre o mesmo (Goldman *et al.*, 1998). Em batata são oito os genes de PPO, mas apenas dois apresentam expressão significativa nos tecidos (Thygesen *et al.*, 1995).

Para verificar o número de cópias dos genes em palmito, as seqüências PPOEd17 e PPOAc45 foram usadas para a confecção das sondas radioativas para uso nas análises de Southern após a obtenção de um mapa de restrição destes fragmentos (figura 17). Os DNAs foram digeridos com as enzimas Hind III e Dra I. Estas sondas identificaram um gene de PPO em juçara, açaí e pupunha (Figura 16).

Quando a sonda de açaí foi usada, detectou-se uma banda em DNA de açaí, o que seria esperado, e duas bandas em DNA de juçara e nenhuma em pupunha. Quando a sonda de juçara foi usada, detectou-se uma banda no DNA de açaí tratado com Hind III, uma no DNA de juçara e uma no de pupunha. A diferença entre a detecção de duas bandas no DNA de juçara tratado com Hind III e hibridizado com sonda de açaí, mas uma com a própria sonda é porque em uma das suas extremidades da sonda de juçara existe um ponto de corte para Hind III (figura 17).

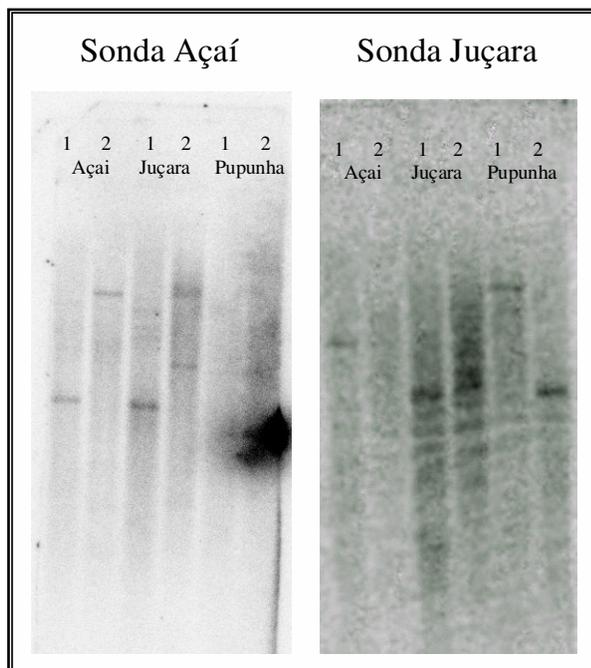


Figura 16. Bandamento do Southern blot de juçara, açai e pupunha digeridos com as enzimas de restrição (1) Dra I e (2) Hind III. A mancha escura à direita é a hibridização que houve da sonda de açai com o próprio fragmento usado para gerá-la, colocada no poço ao lado e que interferiu na revelação do filme.

Sendo o fragmento de açai maior do que o de juçara, ele teria tamanho suficiente para se hibridizar às duas partes oriundas do tratamento do DNA (e por consequência do gene de PPO). Portanto, é possível concluir que ambas as sondas, ainda que não apresentando alta similaridade, puderam hibridizar com os genes de cada uma, inclusive o da pupunha, identificando apenas um gene. Ainda que seja possível afirmar que as sondas usadas poderiam ter menor similaridade com outros genes de PPO e, portanto, não tê-los evidenciado, vale lembrar que eles representam regiões conservadas de sítios característicos dessas enzimas. As análises por Southern mostraram a presença de um gene de PPO em pupunha e, conjuntamente com os resultados de atividade enzimática e de “*tissue printing*”, seria possível dizer que sua expressão é baixa. Para averiguar esta possibilidade foram feitas tentativas de análises da expressão por Northern blot com RNA extraído do palmito das três palmeiras, utilizando-se a

sonda feita a partir do fragmento PPOEd17 de juçara, que hibridizou em Southern com DNA das três palmeiras. A análise de expressão de PPO em folhas e raízes por Northern não apresentou marcação da membrana, sendo feita análise de expressão por RT-PCR. Para tanto, RNA de folhas novas e do palmito das palmeiras juçara, açaí e pupunha foram extraídos e utilizados na síntese da primeira fita de cDNA.

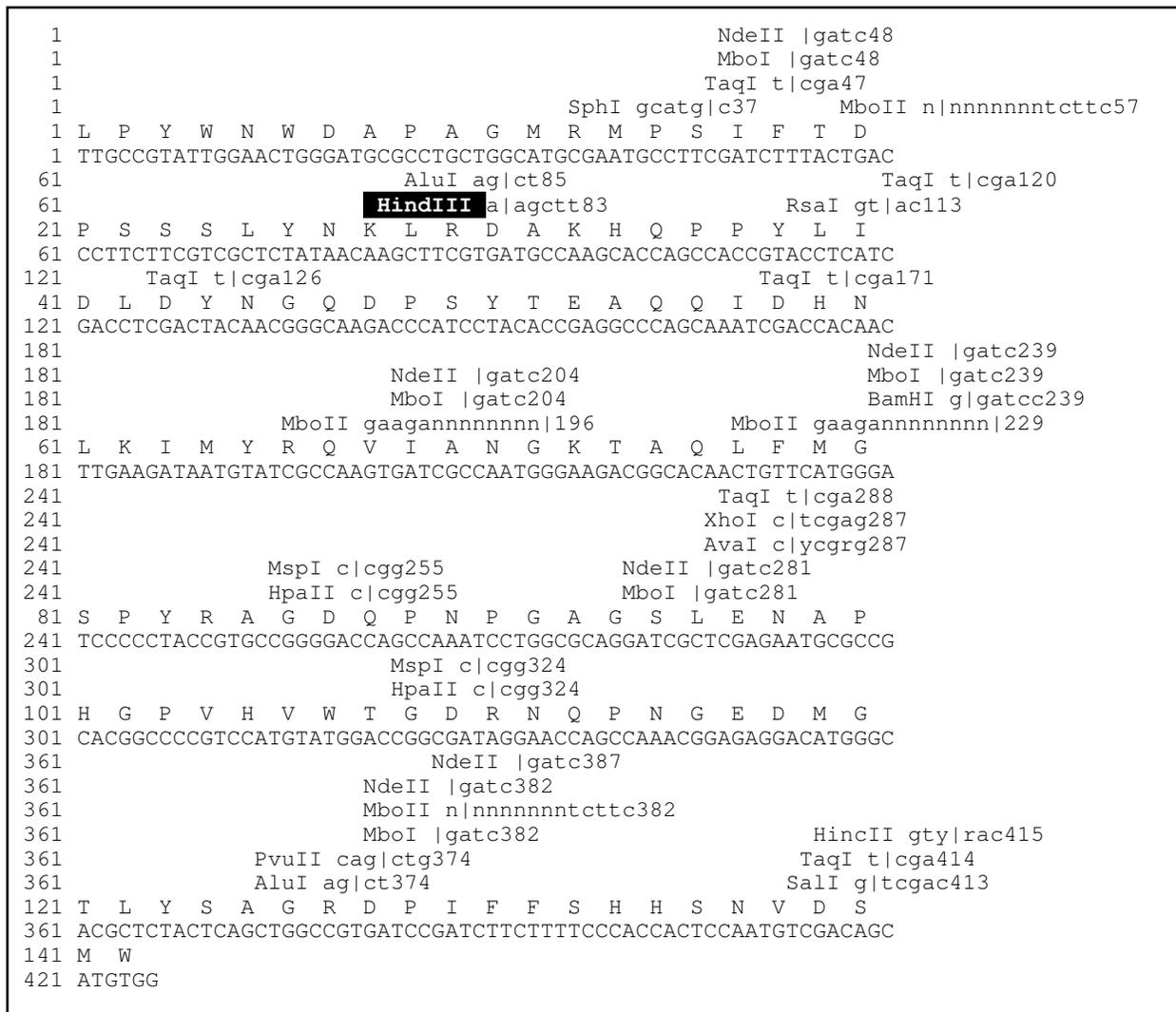


Figura 17: Mapa de restrição da sequência PPOEd17 com a região de corte da Hind III.

Em seguida, quantidades iguais de cDNA foram colocadas nas reações de RT-PCR, sendo a quantificação feita com o uso de primers de ubiquitina, desenhados com base no

alinhamento de várias seqüências retiradas de banco de dados na internet (NCBI). Ubiquitinas são proteínas constantemente sintetizadas nas células e conseqüentemente, servem como bom marcador da quantidade de RNA/cDNA a ser colocada nas reações. As reações de RT-PCR foram alteradas em número e tempo para que não houvesse amplificação excessiva e pudesse ser diferenciada a quantidade dos fragmentos. A figura 18 mostra estes resultados, indicando que a expressão da PPO em pupunha é bastante baixa. Baixa amplificação foi obtida nas folhas das três palmeiras.

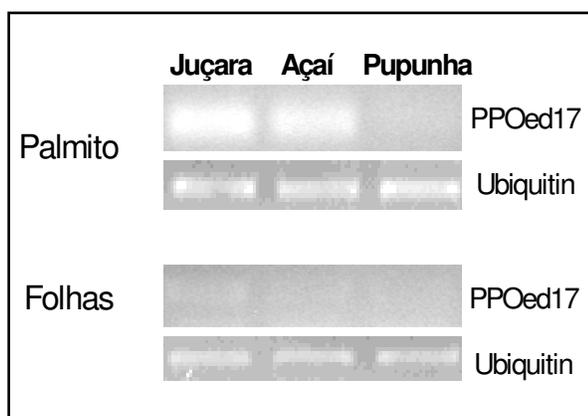


Figura 18. Análise de expressão de PPO (PPOed17) por RT-PCR, em folhas e palmitos de juçara, açai e pupunha tendo a ubiquitina como padrão.

Analisando os dados obtidos pela dosagem de atividade da PPO nas 3 espécies de palmeira, pela análise de fenóis totais e pelos RT-PCR nos mostram que estas PPOs tem o CGA como o melhor substrato, apresentam perda de atividade na presença de SDS, a melhor atividade foi detectada na faixa de pH 5,5 e 6,0 e se mostraram relativamente resistentes a temperaturas altas. PPO de pupunheira apresentou o menor Km para CGA e a menor atividade da PPO entre as 3 palmeiras, apesar de apresentar uma quantidade de fenóis totais igual ou superior as outras 2 espécies. A análise de RT-PCR mostrou baixa transcrição de PPO em palmito de pupunheira. Podemos concluir por estes dados que a baixa oxidação em palmito de pupunheira se deve a sua baixa expressão aliada a pequena quantidade de CGA e/ou pela

pouca afinidade que a PPO desta palmeira teria pelos outros fenóis presentes no palmito.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M. & Kerbauy, G.B., 1996. Micropropagation of *Bactris gassipaes* (Palmae) through flower bud culture. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 8:215-217.
- Bovi, M. L. A., 1998. Palmito pupunha: informações básicas para cultivo. Boletim Técnico IAC 173, 50p.
- Bucheli, C. S., Dry, I. B. & Robinson, S. P., 1996. Isolation of a full-length cDNA encoding polyphenol oxidase from sugarcane, a C4 grass. Plant Mol. Biol. 31:1233-1238.
- Callis, J., 1995. Regulation of protein degradation. Plant Cell 7:845-857.
- Clay, J.W., 1997. Harvesting Wild Species: Implications for Biodiversity Conservation. The Johns Hopkins University Press. 704p.
- Constabel, C. P., Bergey, D. R. & Ryan, C. A., 1996. Polyphenoloxidase as a component of the inducible defense response in tomato against herbivores. In: Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions (J. T. Romeo; J. A. Saunders and P. Barbosa, eds). Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 30. Plenum Press: New York. 231-252p.
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7:1085-1097.
- Dixon, R. A., Lamb C. J., Masoud, S., Sewalt, V. J. H. & Paiva, N. L., 1996. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - A review. Gene 179: 61-71.
- Dry, I. B. & Robinson, S. P., 1994. Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase. Plant Mol. Biol. 26:495-502.
- Ferreira, V. L. P., Bovi, M. L. A., Angeluci, E., Figueiredo, I. B., Yokomizo, Y. & Sales, A.

- M., 1982a. Estudo dos palmitos das palmeiras e do híbrido de *Euterpes Edulis* Mart. E *Euterpes Oleracea* Mart. II – Avaliações físicas e químicas. Coletânea do ITAL 12:243-254.
- Ferreira, V. L. P., Bovi, M. L. A., Draetta, I. S., Paschoalino, J. E. & Shirose, I., 1982b. Estudo do palmito do híbrido das palmeiras *Euterpe edulis* Mart. (juçara) e *Euterpe oleracea* Mart (açai). I. Avaliações físicas, organolépticas e bioquímicas." Coletânea do ITAL 12: 27-42.
- Ferreira, V. L. P.; Graner, M.; Bovi, M. L. A.; Draetta, I. S.; Paschoalino, J. E. & Shirose, I., 1982c. Comparação entre os palmitos de *Guilielma gasipaes* Bailey (pupunheira) e *Euterpe edulis* Mart. (juçara). I - Avaliações físicas, organolépticas e bioquímicas. Coletânea ITAL, 12:255-272.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. J. Agric. Food Chem. 45:1523-1540.
- Frohmann, M. A., Dush, M. & Martin, G. R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single genetic specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-9002.
- Galetti, M. & Fernandez, J. C., 1998. Palm heart harvesting in the Brazilian Atlantic Forest: changes in industry structure and the illegal trade. J. Appl. Ecol. 35:294-301.
- Goldman, M. H. S., J. Seurinck, et al. (1998). "A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase." Plant Mol. Biol. 36: 479-485. Guerra & Handro, 1998
- Halder, J., Tamuli, P. & Bhaduri, A. N., 1998. Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (*Camellia sinensis*). J. Nutr. Biochem. 9(2):75-80.
- Hill, J., 1980. The remobilization of nutrient from leaves. J. Plant Nutr. 2: 407-444.
- Iaderoza, M. & Draetta, I. S. 1982. Isolamento e caracterização dos compostos fenólicos do

- palmito de *Euterpe edulis* Mart. Coletânea do ITAL 12: 151-161.
- Kiyuna I., Santiago, M. M. D. & Bovi, M. L. A., 1997. Simulação da viabilidade econômica da cultura do palmito híbrido (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*) no Estado de São Paulo. Informações Econômicas- Revista Científica do IEA 27:25-40.
- Lourenço, E. J., Leão, J. S. & Neves, V. A., 1990. Heat inactivation and kinetics of polyphenoloxidase from palmito (*Euterpe edulis*). J. Sci. Food Agric. 52: 249-259.
- Mayer, A. M. & Harel, E., 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Food Enzymology. Vol. 1. P. F. Fox. London, Elsevier Applied Science. 1:373-398.
- Mazzafera, P. & Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. Phytochemistry 55:285-296.
- Mazzafera, P., 1997. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. Food Chem. 60:67-71.
- Moore, D., 1987. Section IV: Analysis of DNA Sequences by Blotting and Hybridization. In: Ausubel, Frederick M. *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc. 3v. v.1, Unit 2-9A.
- Paschoalino, J.E., 1978. Aspectos sobre o escurecimento do palmito durante o processamento. Boletim do ITAL 56:175-181.
- Pearson, W. R., Wood, T., Zhang, Z. & Miller, W., 1997. Comparison of DNA sequences with protein sequences. Genomics 46:24-36.
- Rathjen, A. H. & Robinson, S. P., 1992. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. Plant Physiol. 99:1619-1625.
- Ricquebourg, S. L., Robert DaSilva, C. M. F., Rouch, C. C., & Cadet, F. R., 1996. J. Agric. Food Chem., 44, 3457.
- Robert, C., Cadet, F., Rouch, C., Pabion, M. & Richard-Forget, F., 1995. Kinetic study of the irreversible thermal deactivation of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase

- and effect of pH. *J. Agric. Food Chem.* 43:1143-1150.
- Robert, C., Richard-Forget, F., Rouch, C., Pabion, M. & Cadet, F., 1996b. A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 457-463.
- Robert, C., Rouch, C., Cadet, F., 1997. Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.* 59:355-360.
- Robert, C., Rouch, C., Cadet, F., 1998. Inhibition of palmito polyphenoloxidase by halide salts. *J. Enzyme Inhibition.* 13:285-290.
- Robert, C., Rouch, C., RichardForget, F., Pabion, M. & Cadet, F., 1996a. Partial purification and physicochemical characterization of *Acanthophoenix rubra* polyphenol oxidase. *Plant Physiol. Biochem.* 34:369-375.
- Robinson, S. P., Loveys, B. R. & Chacko, E. K., 1993. Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Aust. J. Plant Physiol.* 20:99-107.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Vol 1. 2ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Sartor, R. M. & Mazzafera P., 2000. Caffeine formation by suspension cultures of *Coffea dewevrei*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43:61-69.
- Silva, E. & Nogueira, J. N., 1983. Efeito do calor na atividade da polifenol oxidase e peroxidase em algumas frutas e hortaliças. *Anais da ESALQ XL*:137-161.
- Sojo, M. M., Nunez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sanches-Ferrer, A., 1998a. Monophenolase activity of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 46:4931-4936.
- Sojo, M. M., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 1998b. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using triton X-114 and PEG 8000 for

- removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46:4924-4930.
- Steffens, J. C., Harel, E. & Hunt, M. D., 1994. Polyphenol oxidase. In: *Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 28. *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*; B. E. Ellis; G. W. Kuroki and H. A. Stafford, Eds.; Plenum Press: New York. 275-312p.
- Stewart, C. N., Via, L. E., 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for rapid fingerprinting and other RT-PCR applications. *Biotechniques* 5:748-750.
- Swain, T. & Hillis, W. E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10: 63-68.
- Tabora Jr., P. C., Balick, M. J., Bovi, M. L. A. & Guerra, M. P., 1993. In: *Pulses and Vegetables*, Chapman & Hall. Thipyapong, P., Joel, D. M. & Steffens, J. C., 1997. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiol.* 113:707-718.
- Thygesen, P. W., Dry, I. B. & Robinson, S. P., 1995. Polyphenol oxidase in potato. a multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109:525-531.
- Walker, J. R. L.; McCallion, R. F., 1980. The selective inhibition of ortho and para diphenol oxidases. *Phytochemistry* 19:373-377.
- Whitaker, J. R., 1995. Polyphenol oxidase. *Food Enzymes - Structure and Mechanism*. D. W. S. Wong. New York, Chapman & Hall. 271-307p.
- Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, Nakamura, N. & Hayashi, N., 200. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48(7):2732-2735.