

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

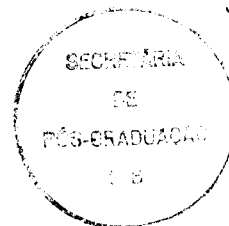
BC/43628

IB/81593

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia**



CÍNTIA LOSANO COSTA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
FLAVOPROTEÍNA ÓXIDO-REDUTASE DE *ARABIDOPSIS
THALIANA* INDUZIDA POR INJÚRIA MECÂNICA E METIL
JASMONATO**

Exemplar correspondente à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Cíntia Losano Costa
e aprovado para a Comissão

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
Obtenção do título de Mestre em Genética
E Biologia Molecular na área de Genética
Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. **CELSO EDUARDO BENEDETTI**
Co-orientador: Prof. Dr. **PAULO ARRUDA**

CAMPINAS – SP 2000

UNIDADE	IB/81593
N.º CHAMADA:	1/UNICAMP
	C823i
V.	Ex.
TOMBO BC/	43628
PROC.	16-39210.1
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	07/02/01
N.º CPD	

CM-00153429-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C823i **Costa, Cíntia Losano**
Isolamento e caracterização de uma flavoproteína oxido-
redutase de *Arabidopsis thaliana* induzida por injúria mecânica
e metil jasmonato/Cíntia Losano Costa. - - Campinas-SP. [s.n.],
2000.

55f: ilus.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti
Co-Orientador: Paulo Arruda
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Ácido jasmônico. 2. Ferimento. 3. Arabidopsis. I. Benedetti,
Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título

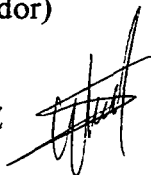
Campinas, 28 de novembro de 2000.

BANCA EXAMINADORA

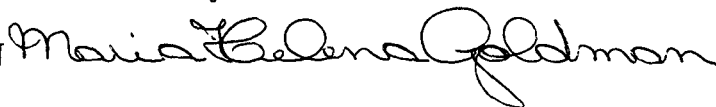
Prof. Dr. CELSO EDUARDO BENEDETTI (Orientador)



Prof. Dr. MICHEL GEORGES ALBERT VINCENTZ



Profa. Dra. MARIA HELENA GOLDMAN



Prof. Dr. MARCELO MENOSSE TEIXEIRA

*Aos meus pais e irmãos que tudo
fizeram para que eu pudesse estar aqui*

*Ao meu Pequeno e ao pequeno Lucas que me ensinam
diariamente o que a Ciência não pode ainda explicar*

Agradecimentos

Ao orientador Celso E. Benedetti que me aceitou como aluna de Iniciação Científica e posteriormente de Mestrado e que com sua enorme paciência e dedicação me ensinou muito sobre a Ciência e a Vida.

Ao Prof. Paulo Arruda por ter aberto as portas de seu laboratório onde pude me iniciar na carreira científica.

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

Ao Dr. Vincent Massey por ter enviado os anticorpos contra as proteínas OYE1 e OYE3.

Aos amigos do Lab. que tornaram o convívio divertido e muito, muito animado. Não seria possível aqui enumerar todos e tudo o que fizeram por mim, pois correria o risco de ter esta sessão de agradecimentos maior que a própria tese!!

À Daniela que coloca diariamente todos os Laboratórios nos trilhos.

Às secretárias do CBMEG por terem quebrado tantos e tantos galhos desde que me conheceram.

À FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

Índice

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Introdução.....	10
- Injúria Mecânica em Plantas.....	10
- Vias de Sinalização em Resposta a Injúria Mecânica.....	10
- Ácido Jasmônico e as Vias de Sinalização em Resposta a Injúria Mecânica.....	12
- Vias de Transdução de Sinal	16
- Fitormônios Etileno e Ácido Abscísico Agindo em Conjunto com Ácido Jasmônico em Resposta a Ferimento.....	18
- <i>Arabidopsis thaliana</i> e o mutante <i>coil</i>	20
- O gene <i>COII</i>	21
Objetivos.....	23
Apresentação de Publicação.....	24
Discussão.....	36
Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas.....	44

Índice de Figuras

Figura 1: Via de biossíntese de ácido jasmônico.....	13
Figura 2: Comparação entre vias de sinalização de resposta de defesa em plantas e mamíferos.....	15
Figura 3: Esquema geral de resposta de defesa local e sistêmica em plantas.....	19
Figura 4: Hipóteses sobre a interação entre a proteína COI1 e a expressão do gene <i>OPR3</i>	41

Resumo

Nas últimas décadas, ácido jasmônico (AJ) e seu metil éster (MeJA) foram reconhecidos como compostos reguladores de desenvolvimento de plantas capazes de agirem também como sinalizadores em resposta a estresse biótico e abiótico. Utilizando a técnica de *differential display* de RNA, identificamos um gene de *Arabidopsis thaliana*, rapidamente expresso em folhas após injúria mecânica ou tratamento com MeJA. Esse gene, denominado OPR3, apresenta alta identidade com FMN-binding proteins incluindo, *old yellow enzymes* (OYEs) de leveduras e oxofitodienoato redutases (OPRs) de *Arabidopsis*. A expressão do gene OPR3 é significativamente reduzida em folhas feridas do mutante *coil* sugerindo a dependência da percepção de ácido jasmônico para sua completa indução. Ensaio de cinética enzimática mostraram que a proteína recombinante OPR3 oxida β -NADPH em presença de OPDA (ácido oxofitodienóico), prostaglandina (PGJ2) e ciclohexenona, compostos que possuem uma insaturação em seu anel cetônico. Quando metil jasmonato e ciclohexanona foram utilizados como substrato não foi possível identificar atividade da proteína OPR3, o que sugere que esta enzima apresenta especificidade em clivar ligações duplas em anéis cetônicos de seus substratos. Estes resultados estão em concordância com dados anteriormente descritos para as flavoproteínas OPR1, OPR2 e OYE. Os dados obtidos nesta pesquisa mostram que o gene OPR3 codifica uma terceira isoforma de OPR de *Arabidopsis* cuja expressão é induzida em resposta à injúria mecânica.

Abstract

In the last decades, jasmonic acid (JA) and its methyl ester (MeJA) were recognized as regulators of plants development, being able also to act as biotic and abiotic stress response signals. Using differential display of RNA, we identified an *Arabidopsis thaliana* gene, rapidly expressed in leaves upon wounding or MeJA treatment. This gene, named OPR3 shows high identity with FMN-binding proteins including, old yellow enzymes (OYEs) from yeast and oxophytodienoate reductases (OPRs) from *Arabidopsis*. Expression of the OPR3 gene was significantly reduced in wounded leaves of the *coil* mutante indicating partial dependence on jasmonate perception for full induction of the gene. Enzyme assays showed that the recombinant OPR3 oxidizes β -NADPH when OPDA (oxophytodienoic acid), prostaglandin (PGJ2) and ciclohexenone, which have a unsaturation in their ketone ring, were used as substrate. β -NADPH oxidation was not observed when methyl jasmonate or ciclohexanone were used as substrate, suggesting that OPR3 has specificity to cleavage of oleifinic bonds in cyclic enones. The results show that the OPR3 gene product represents a new OPR of *Arabidopsis* induced after wounding.

Introdução

Injúria mecânica em plantas

Injúria mecânica em plantas resulta na rápida ativação de genes que atuam, basicamente, em dois tipos de resposta (Bowles *et al.*, 1993): uma resposta local e uma sistêmica. A resposta local, que ocorre em células próximas ao ferimento, é caracterizada pela indução de um conjunto de genes envolvidos na recuperação do tecido lesado, determinando um aumento do processo de divisão e diferenciação celular (Ryan *et al.*, 1990). Através de um sistema de comunicação que envolve sinais químicos e/ou elétricos, as células próximas ao local do ferimento acionam uma resposta de defesa sistêmica que é transmitida aos tecidos distais da planta e ativam um conjunto de genes responsáveis pela resposta de defesa contra patógenos (Bögre *et al.*, 1997). Essa resposta caracteriza-se pela expressão de genes que codificam proteínas envolvidas principalmente na proteção do tecido contra enzimas digestivas de insetos como, por exemplo, os inibidores de proteases (Ryan *et al.*, 1990).

Ferimentos em plantas causados por herbívoros, ataque por patógenos ou por injúria mecânica induzem respostas semelhantes, o que permite sugerir que o processo de transdução de sinal ativado por injúria mecânica seja bastante similar ao induzido por estresse biótico (Baron e Zambryski, 1995).

Vias de sinalização em resposta a injúria mecânica

Dentre as respostas celulares para estímulos externos, respostas ativadas por injúria mecânica são consideradas bastante rápidas. Em tomate, por exemplo, ferimentos causam

um aumento do potencial elétrico celular um minuto após injúria (Wildon *et al.*, 1992) e a expressão de proteínas quinases em várias espécies de plantas ocorre poucos minutos após dano celular (Bögre *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 1995, Usami *et al.*, 1995).

A regulação da expressão de genes em resposta a estresses biótico e abiótico tem sido amplamente estudada e podem ser destacadas como moléculas sinalizadoras desta resposta: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras espécies reativas de oxigênio (Lamb e Dixon, 1997), os fitormônios ácido jasmônico (AJ) e seus precursores, conhecidos coletivamente como jasmonatos (Creelman e Mullet, 1997), etileno (Bolwes, 1991), ácido salicílico (SA) e o polipeptídeo sistemina, estes dois últimos relatados como responsáveis pela propagação do sinal de defesa aos tecidos distais da planta (Bögre *et al.*, 1997; Schaler e Ryan, 1995). Potenciais eletroquímicos também têm sido propostos como sinalizadores sistêmicos (Wildon *et al.*, 1992).

Alguns destes compostos apresentam meia-vida bastante curta, como o H_2O_2 e outros radicais de oxigênio, e podem apenas ativar genes em uma área pequena que inclui o sitio de ferimento (Levine *et al.*, 1994). Outros, como sistemina e SA são transportados pelo tecido vascular e podem ativar respostas de defesa em regiões distantes ao ferimento (Shulaev *et al.*, 1995).

Sinais sistêmicos, assim como os locais, causam acúmulo de jasmonatos que, agindo em conjunto com etileno, ativam a expressão de genes em resposta à injúria mecânica (O'Donnell *et al.*, 1996). Estudos em tomate mostraram que, após ferimento, uma proteína de 200 aminoácidos, chamada pró-sistemina, é processada em sistemina que é translocada via floema para os demais tecidos da planta promovendo uma resposta sistêmica. Sistemina interage com receptores celulares específicos ativando lipases de membrana que resultam em produção de ácido linolênico e, conseqüentemente, de AJ e

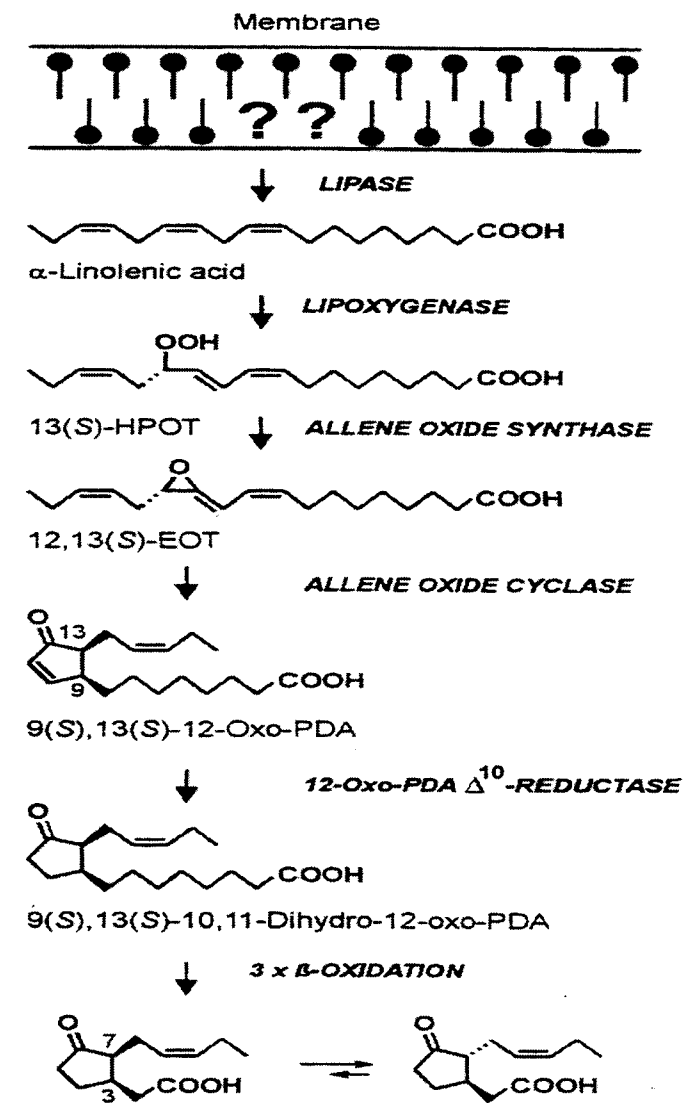
metil jasmonato (MeJA), responsáveis pela ativação de vários genes de defesa (Bögre *et al.*, 1997; Schaller e Ryan 1995; Farmer e Ryan, 1992) (Fig. 1).

Embora todos esses compostos estejam envolvidos em resposta à injúria mecânica, a seqüência de eventos, a relação entre esses fatores e a ativação transcricional dos genes de defesa não estão completamente elucidados (Penninckx *et al.*, 1998).

A via de transdução de sinal que resulta na ativação de genes envolvidos na recuperação do tecido lesado nas proximidades do sítio de ferimento é semelhante àquela descrita para sinalização sistêmica. Entretanto, é independente de sistemina e se inicia com a produção de ácido linolênico pela ação de lipases após uma perturbação na membrana plasmática (Conconi *et al.*, 1996).

Ácido jasmônico e as vias de sinalização em resposta à injúria mecânica

A via de biossíntese de AJ (Fig. 1) foi inicialmente descrita por Vick e Zimmerman (1983). Esta via tem sido bastante estudada desde que Farmer e Ryan (1992) a correlacionaram com a cascata induzida por injúria mecânica que leva a expressão de um gene de defesa que codifica o inibidor de protease 2 (*pin2*) de tomate. Em estudos posteriores, AJ foi reconhecido como um importante sinalizador em vários processos celulares, como: respostas a estresses biótico e abiótico (Herde *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1994), regulação da síntese de fitoalexinas em cultura de células (Ellard-Ivey e Douglas, 1996; Gundlach *et al.*, 1992), maturação de grãos de pólen (McConn e Browse, 1996; Feys *et al.*, 1994) e germinação de sementes (Hause *et al.*, 1996; Creelman e Mullet, 1995).



Mueller, M.J. (1997) *Physiol. Plant.* 100: 654

Figura 1: Via de biossíntese de ácido jasmônico a partir de ácidos graxos de membrana plasmática de células vegetais como descrito por Vick e Zimmermann (1983).

Ácido jasmônico é formado a partir do ácido linolênico, em uma via enzimática contendo sete passos (Fig. 1). Inicialmente, a enzima 13- lipoxigenase (13-LOX) catalisa a conversão de ácido linolênico a ácido 13(S)-hidroperoxi-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatrienóico. Uma aleno óxido sintase (AOS) e uma aleno óxido ciclase (AOC) formam o ácido 12-oxo-fitodienóico (OPDA), que é reduzido a ácido 12-oxo-fitoenóico (OPC 8:0) pela ação de enzima OPDA-redutase. Esse composto é submetido a três passos de β -oxidação formando (+)-7-iso-AJ que é rapidamente convertido em sua estrutura estável (-)-AJ (Farmer e Ryan, 1992).

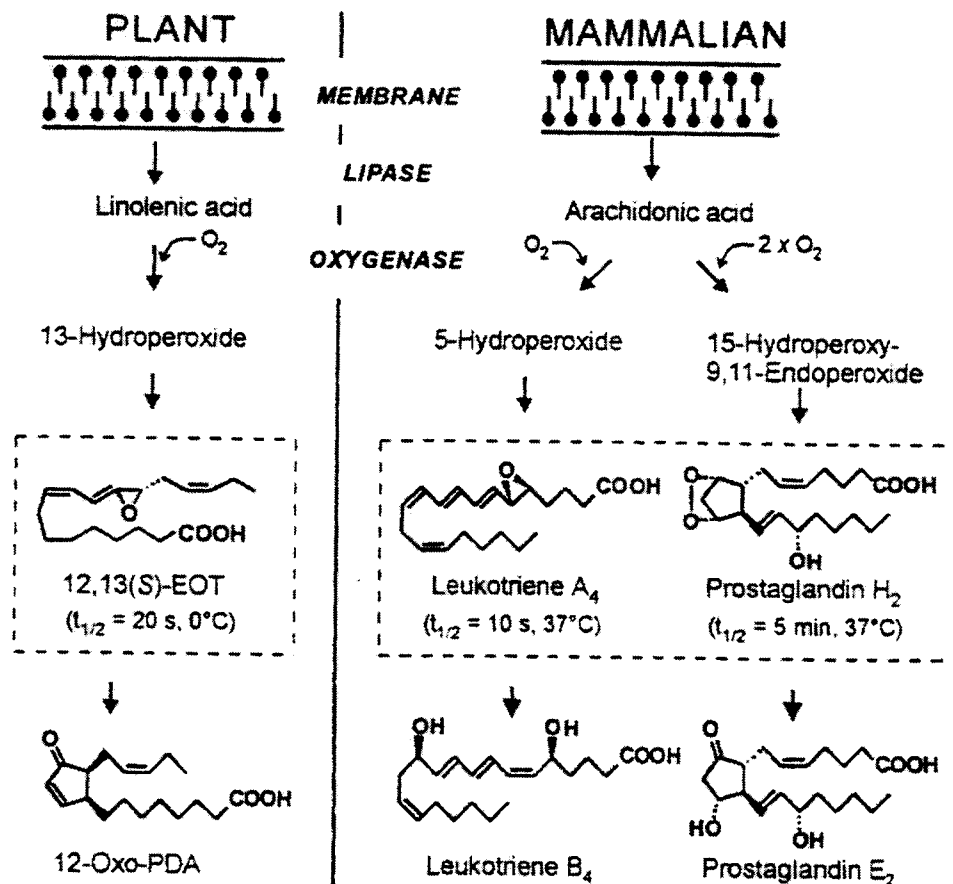
Estudos recentes em batata e *Arabidopsis* mostraram que tanto AJ, OPDA, e dinor-OPDA, um derivado de OPDA contendo apenas seis átomos de carbono na cadeia alifática, podem ativar genes expressos normalmente em resposta a injúria mecânica, e apresentam diferentes níveis de ação em diferentes plantas (Weber *et al.*, 1997).

Wasternack e colaboradores (1998) mostraram, posteriormente, que em tomate, 12-OPDA e outros intermediários da via de síntese de AJ devem ser β -oxidados para promoverem a indução de genes de resposta a ferimento com maior eficiência. Isto mostra que os compostos mais ativos na cascata de sinalização a ferimento podem diferir entre as várias espécies de plantas já estudadas (Wasternack *et al.*, 1998).

A importância dos jasmonatos em resposta a ferimentos está bem estabelecida, mas pouco é conhecido sobre os elementos intracelulares que interagem posteriormente aos jasmonatos na cascata de regulação da expressão gênica em resposta a injúria mecânica (Wasternack *et al.*, 1998).

Esses estudos sugerem que a sinalização de resposta a ferimento é mediada por uma via octadecanóica análoga ao mecanismo de sinalização de processos inflamatórios em

mamíferos. Essa via resulta na produção de prostaglandinas e leucotrienos cuja estrutura molecular apresenta grande semelhança a AJ (Mueller, 1997) (Fig. 2).



Mueller, M.J. (1997) *Physiol. Plant.* 100: 659

Figura 2: Comparação entre as vias de sinalização de defesa em plantas (à esquerda) e mamíferos (à direita). Pode-se observar a similaridade entre os passos enzimáticos e a estrutura molecular dos compostos que são responsáveis pela resposta de defesa em plantas (12-oxo-PDA) e os leucotrienos e prostaglandinas, responsáveis pela resposta inflamatória em mamíferos.

Vias de transdução de sinal

A fosforilação de proteínas é um dos principais mecanismos de controle de funções celulares em resposta a estímulos externos em vários organismos. Uma classe específica de proteínas serina/treonina quinase, designada MAP quinases (*mitogen-activated protein*), está envolvida em muitos destes processos (para revisão, Hirt, 1997).

MAP quinases têm sido descritas como participantes do processo de transdução de sinal de defesa também em plantas (Seo *et al.* e 1995). O modelo de sinalização de resposta a ferimento inicialmente proposto por Farmer e Ryan (1992) sugeria que um sinal inicial de resposta a ferimento, como, por exemplo, uma perturbação na parede celular, estimularia a fosforilação de proteínas quinases que levariam a ativação de enzimas envolvidas na biossíntese de AJ (Farmer e Ryan, 1992).

Essa hipótese foi confirmada após a detecção de um rápido e sistêmico aumento dos níveis de um transcrito que codifica uma MAP quinase isolada de folhas de tabaco (WIPK - *wound-induced protein kinase*). Essa proteína é rapidamente induzida por injúria mecânica, precedendo o aumento dos níveis endógenos de AJ ou o acúmulo de produtos gênicos em resposta a ferimento (Seo *et al.*, 1999 e 1995). Esses dados indicam que MAP quinases ocupam uma posição anterior aos jasmonatos na cascata de sinalização em resposta à injúria mecânica (Seo *et al.*, 1995). Sugere-se que uma proteína análoga à sistemina poderia ativar WIPK em sítios distantes ao ferimento, contudo, um análogo de sistemina não foi ainda descrito em tabaco (Seo *et al.*, 1999).

Estudos em alfafa e em outras espécies de plantas demonstraram que diferentes tipos de estresses, tanto bióticos quanto abióticos, como por exemplo baixas temperaturas (Jonak *et al.*, 1996), dessecação (Mizoguchi *et al.*, 1997) e ataque por patógenos (Suzuki e Shinshi, 1996), induzem a produção de proteínas homólogas à MAP quinase, sugerindo que

tais quinases são parte inicial de uma resposta à diferentes tipos de estresses (Bögre *et al.*, 1997; Jonak *et al.*, 1996; Bögre *et al.*, 1996; Usami *et al.*, 1995).

Admite-se também que mudanças instantâneas de pressão hidráulica devido a injúria mecânica (Malone, 1992) e alterações elétricas no sítio de ferimento (Wildon *et al.*, 1992), também possam estar envolvidas na ativação sistêmica de proteínas quinases em resposta a ferimento.

Estudos recentes mostraram que a sistemina causa um aumento do cálcio intracelular em mesófilos de tomate (Moyen *et al.*, 1998). Em mamíferos a calmodulina (CaM) complexa o cálcio intracelular e esse complexo modula a atividade de inúmeras proteínas incluindo, quinases, fosfatases e lipases (Qui *et al.*, 1998; Low e Merida, 1996). Berger e Ryan mostraram que CaM é induzida em plantas após ferimentos ou tratamentos com sistemina, AJ ou MeJA, sugerindo que a ativação de CaM é também regulada pela via de sinalização modulada por jasmonatos (Berger e Ryan, 1999).

Rojo e colaboradores (1998) identificaram em *Arabidopsis* dois genes expressos em resposta a ferimento: *WR3* (*wound-responsive gene 3*) e *CK* (*choline kinase*) cuja indução é independente do acúmulo de AJ, sugerindo assim a existência de uma via alternativa de sinalização para ativação de genes de defesa. Essa via alternativa também é regulada positivamente pela ação de uma proteína quinase levando assim à ativação desses genes de defesa e é regulada negativamente pela ação de uma fosfatase (Rojo *et al.*, 1998). Esses estudos mostraram a existência de ao menos duas vias de transdução de sinal que resultam na ativação de genes em resposta a ferimento, sendo uma dependente e outra independente de AJ e ambas são dependentes de eventos de fosforilação (Rojo *et al.*, 1998) (Fig. 3).

Fitormônios Etileno e Ácido Abscísico (ABA) agindo em conjunto com Ácido Jasmônico em resposta a ferimento

Os fitormônios etileno e ABA têm sido descritos como moduladores positivos da ativação de genes de defesa em plantas (Fig.3). Em tomate, etileno não ativa os genes de defesa, mas a sua produção em resposta a ferimento é necessária para a máxima expressão destes genes. Isso se deve ao fato do etileno agir em cooperação com AJ para ativar genes em resposta a machucado (O'Donnell *et al.*, 1996 e Xu *et al.*, 1994).

Há também evidências de que ABA age como um sinalizador primário para a indução da cascata biossintética de resposta sistêmica que leva a produção de AJ em tomate e batata (Wasternack e Parthier, 1997; Peña-Cortés *et al.*, 1996). O modelo de sinalização sistêmica de resposta a ferimento inicialmente proposto por Farmer e Ryan (1992) foi modificado para incluir ABA como fator necessário e mediador entre sistemina e AJ (Wasternack *et al.*, 1998; Peña-Cortés *et al.*, 1996; Helde *et al.*, 1996). Vários artigos relataram a necessidade do acúmulo de ABA para garantir a resposta sistêmica (Peña-Cortés *et al.*, 1996, 1993 e 1989; Wasternack e Parthier, 1997). Contudo, até o momento não foi esclarecido a razão pela qual os níveis de ABA permanecem elevados mesmo após o decréscimo dos níveis endógenos de AJ (Wasternack e Parthier, 1997).

Em artigo recente, Birkenmeier e Ryan (1998) mostraram que o acúmulo de ABA ocorre preferencialmente no local do ferimento e este acúmulo aparece como um resultado da perda de água no local do ferimento, sugerindo que ABA é necessário para potencializar a resposta de defesa através da manutenção da fisiologia do tecido e não seria responsável diretamente pela iniciação da cascata de sinalização (Birkenmeier e Ryan 1998).

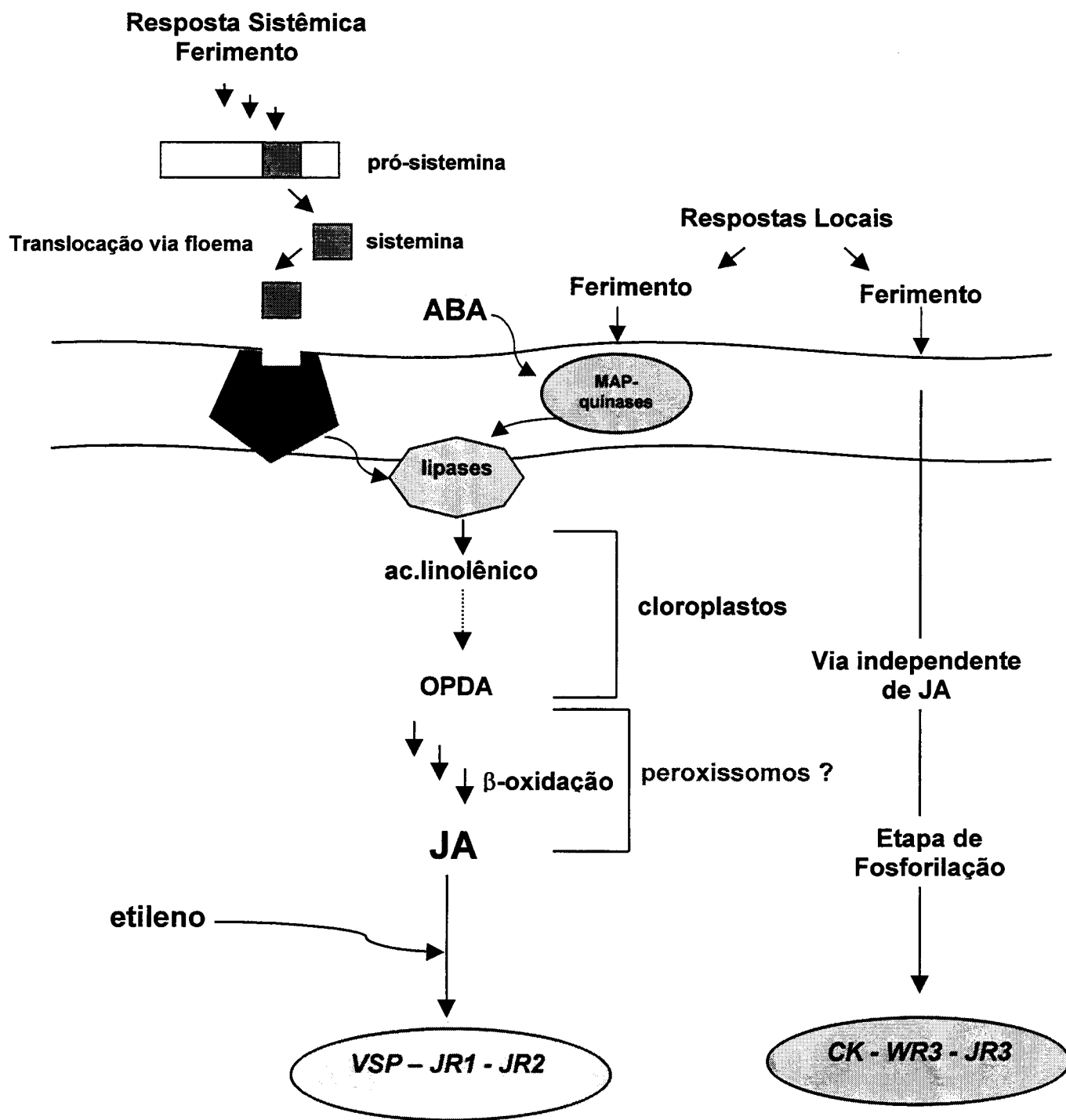


Figura 3: Esquema demonstrando as vias de transdução de sinais local e sistêmica em resposta a ferimento e a interação a entre a via de biossíntese de ácido jasmônico e a expressão de alguns genes de defesa.

Arabidopsis thaliana* e o mutante *coi 1

Arabidopsis thaliana tem sido utilizada como planta modelo para estudos de diferentes vias de transdução de sinais mediadas por fitormônios. Para tal, mutantes apresentando respostas alteradas a etileno (Chang, 1996; Kieber *et al.*, 1993), ABA (Leung *et al.*, 1994, Meyer *et al.*, 1994), auxinas (Hobbie *et al.*, 1994) e citocininas (Kakimoto, 1996) foram caracterizados (Titarenko *et al.*, 1997).

Na tentativa de compreender a via de transdução de sinal que media a ação de jasmonatos, quatro mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensíveis a ácido jasmônico foram isolados. O mutante *jar1* (*jasmonate resistant*) foi isolado após tratamento de sementes com o agente mutagênico etil metanosulfonato e selecionado por não apresentar inibição do crescimento de raiz quando crescido em presença de ácido jasmônico (Staswick *et al.*, 1992). Com o objetivo de estudar o mecanismo de ação da fitotoxina coronatina, mutantes resistentes a essa toxina foram isolados. O mutante *coi1* (*coronatine insensitive*), também obtido por tratamento de sementes com etil metanosulfonato, foi selecionado por apresentar resistência à coronatina, uma fitotoxina cuja estrutura molecular é semelhante à do OPDA. Esse mutante além de não apresentar inibição do crescimento de raiz em meio com metil jasmonato produz flores macho estéreis (Benedetti *et al.*, 1995; Feys *et al.*, 1994). Os mutantes insensíveis a jasmonatos, *jin1* (obtido após tratamento de sementes por radiação γ) e *jin4* (obtidos por inserção de T-DNA) isolados posteriormente não apresentam inibição de crescimento de raiz quando tratados com ácido jasmônico e expressam uma proteína de reserva denominada AtVSP (*vegetative storage protein*) que possui identidade imunológica com VSPs de soja, também induzida por ácido jasmônico (Berger *et al.*, 1995).

AtVSP não é expressa no mutante *coil* mesmo sob indução por MeJA (Benedetti *et al.*, 1995). Isto sugere que nos mutantes *jin1* e *jin4*, o gene que codifica esta proteína não está alterado e que o gene *COII* está anteriormente localizado em relação a *JIN1* e *JIN4* na via de transdução de sinal mediada por ácido jasmônico (McConn *et al.*, 1997).

Recentemente, um mutante triplo apresentando deficiência na síntese de ácido linolênico, *fad3-2fad7-2fad8*, foi isolado (McConn e Browse, 1996). Esse mutante, possui deficiência na produção de enzimas que são responsáveis pela produção dos triglicerídeos que servem de substrato para a produção de ácido linolênico e assim como *coil*, produz flores macho estéreis. No entanto, esse fenótipo pode ser revertido nos mutantes *fad3* pela aplicação de AJ ou ácido linolênico. Semelhante ao mutante *coil*, o mutante *fad3* é mais sensível ao ataque por insetos (*Bradysia impatiens*) e fungos em relação à planta selvagem (McConn *et al.*, 1997). Porém a aplicação de MeJA em plantas *fad3* reduziu de forma significativa o grau de herbivoria e a susceptibilidade a patógenos. Tais experimentos demonstraram, portanto, que jasmonatos são essenciais na expressão de genes envolvidos em resposta de defesa contra insetos e para o desenvolvimento de grãos de pólen em *Arabidopsis* (Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998; McConn *et al.*, 1997 e McConn e Browse, 1996).

O gene *COII*

Entre os vários mutantes insensíveis a AJ, o mutante *coil* foi o primeiro a ser mapeado e ter o locus *COII* caracterizado (Xie *et al.*, 1998). A sequência deduzida da proteína COII contém um domínio “F-box” e domínios repetitivos ricos em leucina (LRR), e apresenta homologia com outras três proteínas com domínios “F-box” e LRR: TIR1, Skp2, e Grr1. Proteínas “F-box” participam do complexo de ubiquitinação, responsável

pela degradação e conseqüente controle da concentração de proteínas celulares (Skowrya *et al.*, 1997). Proteínas “F-box” atuam no reconhecimento do substrato a ser poliubiquitinizado e posteriormente degradado. Essas proteínas são seletivas e capazes de reconhecer mais de um substrato. Sugere-se que a proteína COI1 possa seqüestrar reguladores de desenvolvimento de grãos de pólen e de resposta de defesa para o complexo de ubiquitinização (Xie *et al.*, 1998).

Objetivos

O mutante *coil* de *Arabidopsis* vem sendo estudado em nosso laboratório como uma ferramenta para a identificação de genes regulados por AJ e que portanto, apresentem expressão diferenciada em relação à planta selvagem. Nosso laboratório tem focalizado esforços principalmente na identificação de genes envolvidos em resposta de defesa ou relacionados ao desenvolvimento de grãos de pólen (Benedetti et al, 1998; Capella *et al.*, submetido para publicação).

Esta tese de mestrado teve como objetivo identificar, através da técnica de *Differential Display* de RNA, genes induzidos por injúria mecânica que estão sob o controle do gene *COII*, e cuja a expressão depende de uma via de transdução de sinal mediada por AJ.

Descrevemos neste trabalho o isolamento e a caracterização de um gene, denominado *OPR3* que é rapidamente induzido em folhas de *Arabidopsis* selvagem após ferimento e indução por MeJA e cuja expressão é dependente do gene *COII*.

O trabalho foi recentemente publicado na Revista “ *Plant Molecular Biology* ” e será apresentado aqui para descrever os resultados desta pesquisa.

Apresentação de Publicação:

An Arabidopsis gene induced by wounding functionally homologous to flavoproteins oxidoreductases

Cynthia Losano Costa, Paulo Arruda and Celso Eduardo Benedetti. *Plant Molecular Biology*, 44(1): 61-71, September 2000

Inúmeros estudos anteriores mostraram a importância dos jasmônatos na via de sinalização de defesa contra diferentes tipos de estresse em plantas. Este trabalho teve como objetivos:

- 1) O isolamento de um gene rapidamente induzido por injúria mecânica e metil jasmonato.
- 2) A verificação da dependência da função *COII* para a completa indução do gene isolado.
- 3) A produção da proteína recombinante a partir da expressão em *E. coli* do cDNA isolado, caracterização parcial de sua atividade e determinação da sua possível atividade no mecanismo de sinalização em resposta a injúria mecânica em *Arabidopsis*.

An *Arabidopsis* gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases

Cynthia Losano Costa¹; Paulo Arruda^{1,2} and Celso Eduardo Benedetti^{1*}

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas; ² Depto. de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; Campinas, CP 6109 CEP 13083970, SP, Brazil

Received 20 December 1999, accepted in revised form 2 May 2000

Key words: *Arabidopsis* OPR3, flavoprotein oxidoreductase, wounding, methyl jasmonate

Abstract

The regulation of genes in response to wounding is mediated in part by the octadecanoids 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA) and its methyl ester methyl jasmonate (MeJA). We identified, by differential display, an *Arabidopsis* gene (*OPR3*) induced after wounding. *OPR3* is homologous to members of the flavin mononucleotide (FMN) binding proteins, including the old yellow enzyme (OYE) from yeast and the 12-oxophytodienoate-10,11-reductase (OPR) from *Arabidopsis*. Transcripts of *OPR3* rapidly accumulated in leaves after wounding and MeJA treatment, but they were detected in various tissues of non-wounded plants at relatively low levels. Expression of *OPR3* gene was significantly reduced in wounded leaves of *coi1* mutant, indicating partial dependence on jasmonate perception for full induction of the gene. The recombinant protein of *OPR3* cross-reacted with an antiserum raised against the OYE protein, and showed oxidation of β -NADPH when OPDA or 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (PGJ2), an analogue of OPDA, were used as substrates. β -NADPH oxidation was not observed when MeJA, which lacks the double bond in the ketone ring, was used as substrate. The recombinant OPR3 protein also showed β -NADPH oxidation activity in the presence of cyclohexenone, but not cyclohexanone, suggesting that the enzyme has specificity to cleavage of olefinic bonds in cyclic enones. The results show that the *OPR3* gene product represents a new OPR of *Arabidopsis* induced after wounding.

Introduction

Jasmonic acid and compounds of the octadecanoid pathway are considered a class of defense signals. They accumulate in wounded plants (Creelman *et al.*, 1992) and activate certain wound- and pathogen-responsive genes (Farmer and Ryan, 1992; Menke *et al.*, 1999). In addition, plant mutants defective in jasmonate synthesis or perception are more susceptible to fungi and insect attack (Howe *et al.*, 1996; McConn *et al.*, 1997; Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). The importance of JA in defense against herbivores in natural environment has also been established. For instance, a MeJA-elicited response was

shown to be costly to the plant, but benefited individuals under attack by herbivores in natural populations, by decreasing the rate of attack and increasing the production of viable seeds (Baldwin, 1998).

Although JA mediates wound and defense responses, it probably does not act alone in all circumstances. It is becoming clear that other signals act in accordance with JA to determine specific changes in gene expression after wounding or pathogen infection (Xu *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1998; Rojo *et al.*, 1998). Furthermore, a JA-independent signal transduction controlling wound- and pathogen-induced gene expression was recently identified in *Arabidopsis* (Titarenko *et al.*, 1997; Rojo *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998).

We have used the differential display to isolate *Arabidopsis* genes that are under the control of the

The nucleotide sequence data reported will appear in the EMBL, Gene Bank and DDBJ Nucleotide Databases under the accession AF132212 (*OPR3*)

COI1 gene (Benedetti *et al.*, 1998), and therefore dependent on the JA signal transduction pathway. *COI1* is required for JA-regulated defense, wound healing and pollen fertility and it encodes a protein with leucine-rich repeats and an F-box motif (Xie *et al.*, 1998). Here we describe the isolation and characterisation of a gene that is rapidly induced by wounding and is dependent on *COI1* for its full expression. The gene belongs to the family of FMN binding-proteins, is homologous to 12-Oxophytodienoate-10,11-Reductase (OPR), and encodes a polypeptide with properties of β -NADPH-dependent oxidoreductase over OPDA, a precursor of JA. OPDA has been recognised as an important signal for gene activation (Parchmann *et al.*, 1997) and shown to induce the biosynthesis of different plant volatiles (Koch *et al.*, 1999).

Plant OPRs catalyze the reduction of an olefinic bond in the cyclopentenone ring of OPDA to produce 3-oxo-2-(pent-2'-enyl)-cyclopentane-1-octanoic acid (Schaller *et al.*, 1998), which is then subjected to consecutive rounds of β -oxidation to yield JA (reviewed by Creelman and Mullet, 1997). To date, few members representative of plant OPRs have been identified, and two related OPRs from *Arabidopsis* have been described (Schaller and Weiler, 1997a; Biesgen and Weiler, 1999).

The gene characterized here designated OPR3, differs from previously described OPRs in sequence, tissue specific expression and wound inducibility, and, therefore represents a third member of the *Arabidopsis* OPRs.

Materials and methods

Plant material and chemicals

Wild type *Arabidopsis* ecotype Columbia (Col-0) was used. The *coil* mutant has been described previously (Feys *et al.*, 1994) and was donated by Dr. John G. Turner (University of East Anglia, UK). 12-oxophytodienoic acid (2-cyclopentene-1-octanoic acid, 4-oxo-5-(2-pentenyl)-, [1S-[1 α , 5 α (Z)]]-) and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (Prosta-5,9,12,14-tetraen-1-oic acid, 11-oxo, (5Z, 12E, 14E)-) were obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). MeJA (cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-(2-pentenyl)-, methyl ester [1R-[1 α ,2 α (Z)]]-) was obtained as previously described (Feys *et al.*, 1994), and cyclohexenone and cyclohexanone were from Aldrich

(Milwaukee, WI). β -NADPH, α -NADH, β -NADH, β -estradiol and progesterone were from Sigma (St. Louis, MI).

Plant growth

Seeds of wild type *Arabidopsis* were germinated on MS medium (Murashige and Skoog, 1962), whereas *coil* seeds from a F₂ population segregating for the *Coil* phenotype, were first germinated in MS containing 10 μ M MeJA to select homozygous *coil* plants. Seedlings were grown in white light (70 μ E m⁻² s⁻¹) for ten days in growth cabinet with 16-h-day/8-h-night photoperiod at 22°C, when they were transferred to fresh MS and grown for five days. Seedlings were either transferred to fresh MS or MS-MeJA plates, or moved to soil to grow to maturity.

Wounding and MeJA treatments

Wild type and *coil* seedlings grown as above were transferred to MS or MS containing 10 μ M MeJA. After different periods of incubation, they were frozen in liquid nitrogen and total RNA was extracted.

For the wounding experiment, seeds were germinated in MS and grown for two weeks in short day conditions (9-h-day/15-h-night, at 22°C). Seedlings were transferred to soil and grown for two weeks. Leaves of individual plants were wounded once by making a small cut on their borders, with scissors. After the treatment, plants returned to the growth cabinet and leaves were collected at different periods, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for RNA extraction.

Differential display

Differential display of mRNA was performed based on Liang and Pardee (1992). Total RNA (1 μ g) from leaves of wild type and *coil* plants, extracted 1 h after the wounding, was reverse-transcribed and amplified by PCR as previously described (Benedetti *et al.*, 1998). A differentially displayed band of about 400 bp (AG10), detected by the pair of primers OPP10 (OPERON, Alameda, USA) and T₁₂VG (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA), was purified, cloned and sequenced as described (Benedetti *et al.*, 1998), and used to probe RNA blots.

Northern blots

Total RNA from roots, seedlings, leaves, flowers, siliques and wounded leaves was extracted according to Verwoerd *et al.* (1989). Aliquots of 20 µg of total RNA were fractionated on formaldehyde-agarose gels (Sambrook *et al.*, 1989), transferred onto Hybond N⁺ nylon membranes (Amersham, Little Chalfont, UK) by capillary blot and fixed by UV cross linking according to the manufacturer instructions. Blots were hybridized using the cloned fragments obtained from the display gels or fragments of the *OPR3* cDNA as probes. Membranes were washed twice with 2.0 x SSC containing 0.1 % SDS for 10 min at 42°C and twice with 0.2 x SSC containing 0.1 % SDS for 10 min at 42°C.

cDNA library screening

A cDNA library of *Arabidopsis* (*Landsberg erecta*) kindly donated by Dr. Elliot M. Meyerowitz (California Institute of Technology, Pasadena, USA), was screened following the Stratagene protocols using the cloned AG10 fragment. Eleven independent clones were isolated and sequenced using the dye-terminator reaction kit (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) in an automated ABI DNA sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK). A full-length clone of 1.4 kb (*OPR3* cDNA) containing the sequence identical to the AG10 probe was used for the work described here.

Expression of the *OPR3* recombinant protein and western blot

An *EcoRI/SalI* fragment, generated by PCR, containing the coding region of the *OPR3* cDNA was subcloned into the *EcoRI/SalI* sites of the pMalc2 vector (New England Biolabs, Beverly, USA). Constructs were verified by sequencing and used to transform *Escherichia coli* BL21-lysE cells. The expression of the recombinant MBP-fusion protein was induced with 1 mM IPTG for 2 h, affinity-purified and cleaved on amylose resin, according to the manufacturer protocol (New England Biolabs). Purified proteins were concentrated on microcon columns (Amicon, Beverly, USA), quantified by a Bradford-based method (Bio-RAD, Hercules, USA), and analysed on SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Proteins separated on SDS-PAGE were either stained with coomassie blue or transferred on nylon membranes according to Ausubel *et al.* (1987). After transfer, membranes were incubated in blocking solution (2.5 mM Tris-HCl pH 7.4,

140 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.05% Tween 20, 5% skin milk) at 4° C, over night. Anti OYE 2 or OYE 3 serum, which were kindly sent to us by Dr. Vincent Massey (University of Michigan, USA), was added (1:500) and membranes were incubated for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times for 5 min in TBS-T (2.5 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.05% Tween 20) and incubated in blocking solution containing rabbit anti-IgG (1:5000) conjugated with alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis, MI) for 1 h at room temperature. After washings in TBS-T, membranes were incubated in phosphatase assay buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl) for 5 min at room temperature. Detection of phosphatase activity was done using the substrate CSPD (Tropix) at the 1:2000 dilution, following the manufacturer's instructions.

Enzyme assay and determination of *K_m* and *V_{max}*

Assay reactions were carried out aerobically at 25° C in 1 mL of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 120 µM β-NADPH, 1 µg of purified protein and substrates at different concentrations. Immediately after the addition of the enzyme, the rate of β-NADPH oxidation was measured following the decrease in absorbance of the reduced pyridine nucleotide at 340 nm. The rates of β-NADPH oxidation (nmoles of β-NADPH min⁻¹ µg⁻¹ protein) obtained for different substrate concentrations were used to determine *K_m* and *V_{max}* values using standard procedures.

Results

Isolation of the *OPR3* cDNA and its differential expression in *coil* plants

OPR3 was identified when wounded leaves of wild type and *coil* plants were compared by differential display. A DNA fragment (AG10) detected in wounded leaves of wild type but not *coil* plants was cloned and sequenced. Northern analysis using this fragment as probe confirmed the differential expression of a major transcript of ~ 1.5 kb between the normal and mutant plants in response to wounding (Figure 1). Transcript accumulation was observed in wild type leaves within minutes after the injury, with maximum expression at about one hour after the treatment. A similar pattern of transcript accumulation was observed in leaves of *coil*, however, in much lower

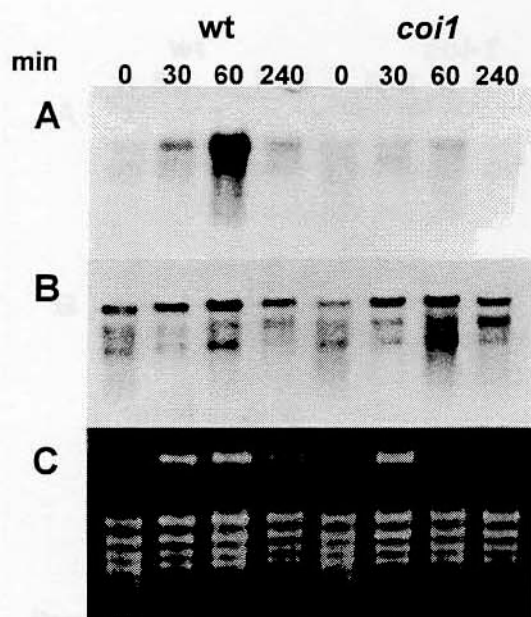


Figure 1. A. Northern blot showing the differential expression of a 1.5 kb mRNA between wild type (wt) and *coi1* leaves after wounding. A pattern of transient transcript accumulation is clearly observed in wild-type leaves after wounding, but less pronounced in *coi1* plants. B. Total RNA probed with a tobacco ubiquitin gene. C. Total RNA stained with ethidium bromide before being transferred onto the membrane.

levels, indicating a partial dependency on jasmonate perception for this response.

AG10 was used to screen an Arabidopsis cDNA library and this resulted in the isolation of several independent clones showing identical sequences. A cDNA (*OPR3*) comprising the entire sequence of the AG10 probe was chosen for further work.

To investigate whether the wounding inducibility of *OPR3* could be mimicked by the action of jasmonates, seedlings were grown in presence of MeJA for different periods. *OPR3* transcripts rapidly accumulated in wild type seedlings after 30 min MeJA treatment, but the induction did not seem to follow a transient pattern when leaves were wounded (Figure 2A). To further verify this, wild-type and *coi1* seedlings were grown in presence of MeJA for periods longer than one hour. Levels of *OPR3* mRNA remained high in wild-type plants during the 24 h of MeJA treatment, whereas in the *coi1* mutants they were not detected (Figure 2B).

In unwounded wild-type plants, *OPR3* mRNA was found in relatively small amounts in green seedlings, leaves and flowers, and in much lower quantities in roots and siliques. Unwounded *coi1* plants showed

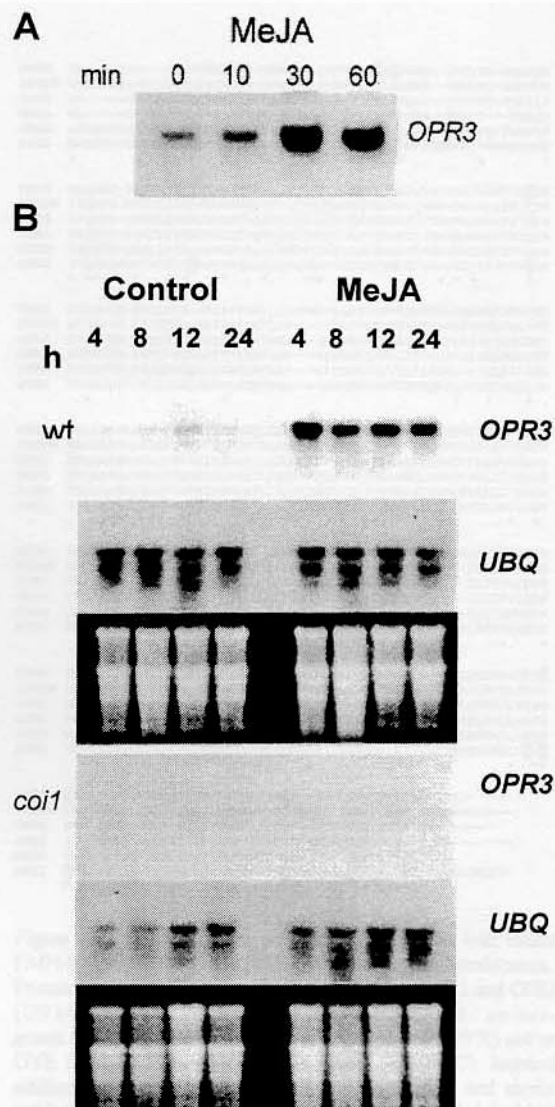


Figure 2. Time-course induction of *OPR3* mRNA from *Arabidopsis* seedlings treated with MeJA (10 μ M). A. *OPR3* induction in wild type (wt) over a 1 h period. B. Wild type, but not *coi1*, shows a significant increase on *OPR3* mRNA transcription in response to MeJA over a 24 h period. Total RNA hybridised to a tobacco ubiquitin gene (UBQ) and total RNA stained with ethidium bromide before being transferred onto the membrane are respectively shown.

even lower amounts of the *OPR3* mRNA in all tissues examined (Figure 3).

Sequence homology and identity of the *OPR3* protein with members of flavoprotein oxidoreductases

The *OPR3* cDNA (accession number AF 132212) has an open reading frame of 1176 nucleotides and en-

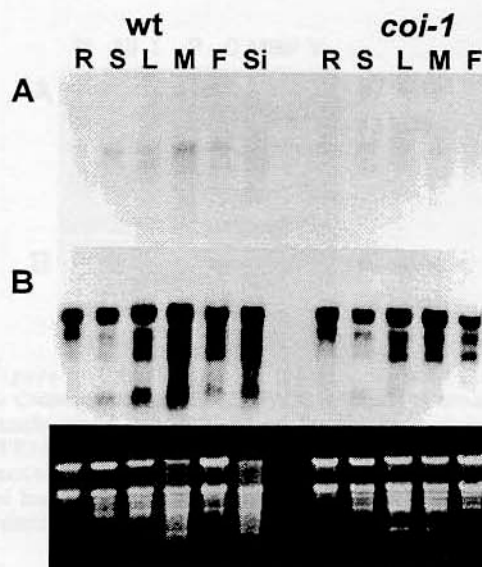


Figure 3. Northern blot for total RNA extracted from different organs of wild type (wt) and *coi-1* plants. **A.** *OPR3* mRNA is expressed at relatively small quantities in seedlings (S), young (L) and mature (M) leaves, and flowers (F), and is hardly detected in roots (R) and siliques (Si). Much lower levels of the corresponding transcript were detected in *coi-1* organs. **B.** Total RNA probed with a tobacco ubiquitin gene. **C.** Total RNA stained with ethidium bromide before being transferred onto the membrane are respectively shown.

codes a protein of 391 amino acids with a calculated molecular mass of 42.8 KDa. The predicted protein of *OPR3* is highly homologous to members of the FMN-binding proteins (Figure 4), including OYEs from *Saccharomyces ssp* (Saito *et al.*, 1991; Stott *et al.*, 1993), OPRs from *Arabidopsis* (Schaller and Weiler, 1997a; Biesgen and Weiler, 1999) and cowpea clones responsive to dehydration (CPRD8) from *Vigna unguiculata* (Iuchi *et al.*, 1996). The *OPR3* protein is also similar to morphinone reductase from *Pseudomonas putida* (French and Bruce, 1995) and glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter* (Snape *et al.*, 1997).

Comparison between *OPR3* and *OYE1* shows that most of the residues responsible for FMN and NADPH binding in the *OYE1* is conserved in *OPR3* (Figure 4), strongly suggesting that *OPR3* is a member of flavoprotein oxidoreductases.

The genomic structure of the *OPR3* gene

While this manuscript was being written, we found a Gene Bank entry (AC006413) for the complete sequence of the *Arabidopsis* chromosome II, BAC F5K7 (Lin *et al.*, direct submission) showing an almost perfect match with the *OPR3* cDNA (not shown). The

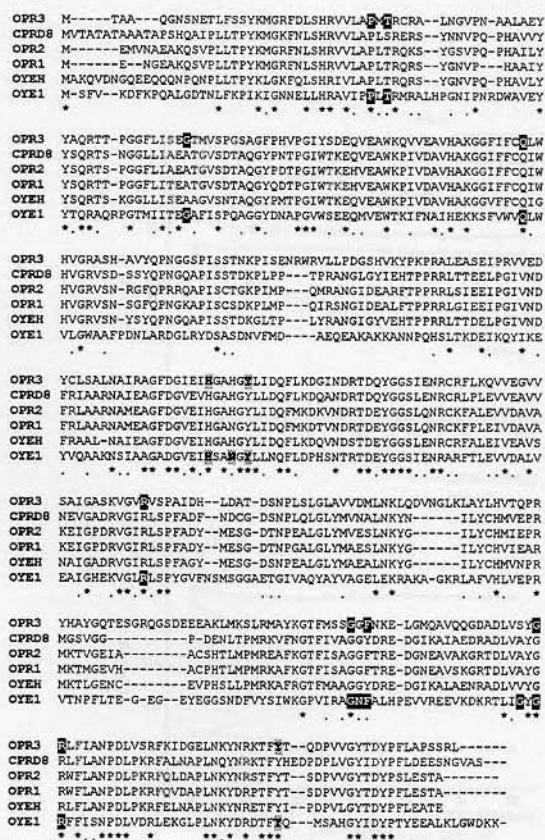


Figure 4. Comparison of the predicted *OPR3* protein with related FMN-binding proteins and NADPH-dependent oxidoreductases. Protein alignments are among *OPR3* (AF132212), *OPR1* and *OPR2* (U92460) from *Arabidopsis*, *OYE1* from *S. calbergenensis* (Q02899), *CPRD8* from *Vigna unguiculata* (D83970) and an *OYE* homolog from *Catharanthus roseus* (AF005237). Identical residues are shown in the consensus by an asterisk, and similar residues are represented by a dot. Amino acids shaded in black correspond to residues in the *OYE1* protein that contribute to FMN binding, whereas amino acids shaded in grey correspond to residues responsible for NADPH binding.

BAC stretch from 79466 to 82477 probably contains the corresponding genomic sequence of *OPR3*. In addition to the predictions made by X. Lin and collaborators who identified three introns within the coding region of *OPR3*, we observed another intron at the 5' end of it, outside of its coding region (not shown).

Southern blot analysis of genomic DNA of Columbia plants indicates that the *OPR3* gene is present in a single copy in the genome (not shown).

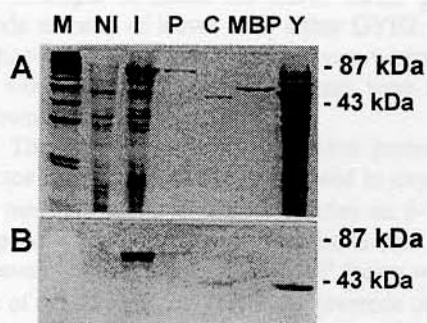


Figure 5. Purification of the recombinant OPR3. A- Coomassie blue stained SDS-PAGE of aliquots of non-induced bacterial extract (NI), IPTG-induced bacterial extract (I), purified OPR3-MBP fusion (P), cleaved OPR3 (C), purified MBP and a yeast total protein extract (Y); M (10 kDa). B- Western blot of a gel loaded with same protein samples shown in A probed with an antiserum raised against the yeast OYE3 protein.

The OPR3 recombinant protein shows properties of flavoprotein oxidoreductases

Although the OYE protein has been extensively studied and shown to reduce several compounds *in vitro*, particularly α - β -unsaturated cyclic enones, its physiological function is less clear (Vaz *et al.*, 1995). Plant OPDA reductases, however, have been shown to catalyze the NADPH-dependent reduction of an olefinic bond in the cyclopentenone ring of 12-oxo-phytyldienoic acid to produce 3-oxo-2-(pent-2'-enyl)-cyclopentane-1-octanoic acid (OPC-8:0), a precursor of JA (Schaller and Weiler, 1997a, b Schaller *et al.*, 1998;). The sequence homology between the OPR3 protein with the OYE and OPR enzymes suggested that the *OPR3* gene would encode a protein with structure/activity similar to these flavoproteins. A recombinant OPR3-MBP fusion protein was expressed in bacteria and purified by affinity chromatography. A fusion protein of about 87 kDa was induced by IPTG, which after cleavage produced a polypeptide of about 43 kDa, very close to the expected 42.8 kDa for the recombinant protein (Figure 5A). Both the 87 kDa and the 43 kDa bands cross-reacted with an antiserum raised against the yeast OYE3 protein (Figure 5B). In addition, the recombinant 43 kDa band migrates at similar position relative to OYE protein (control) from total yeast extracts (Figure 5B) Protein extracts of non-induced bacteria, or the purified MBP (negative control) showed no visible bands cross-reacting with the antiserum.

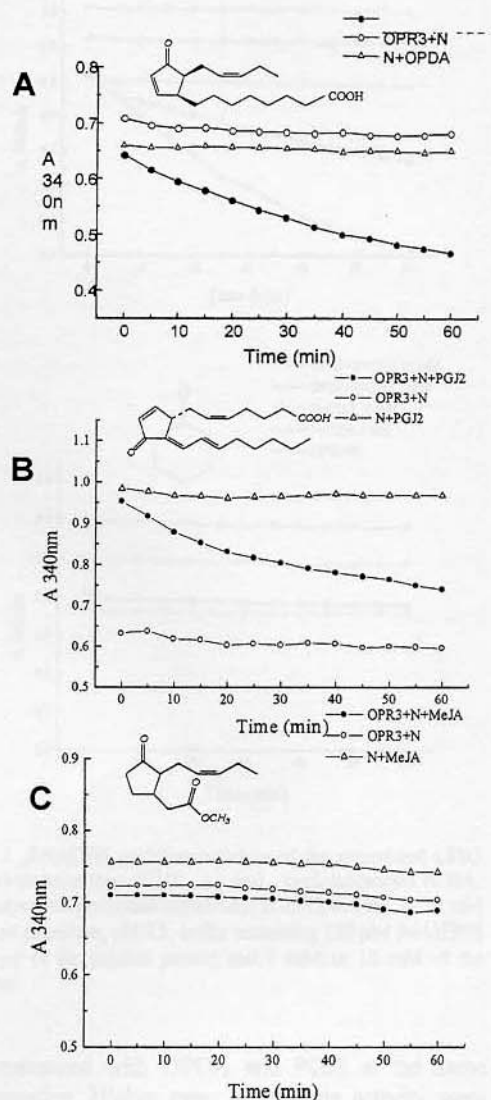


Figure 6. β -NADPH oxidation activities of the recombinant OPR3 over OPDA (A), PGJ2 (B) and MeJA (C). Assays were performed aerobically, at 25°C, in 1 mL of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 120 μ M β -NADPH (N), 1 μ g of the purified protein, and 100 μ M of the substrates. The decrease in absorbances of reduced β -NADPH at 340 nm is dependent on the presence of OPR3 and substrates having a double bond in their ketone ring.

Attempts to detect the native OPR3 protein in crude extracts of leaves with either OYE2 or OYE3 antiserum were unsuccessful, even when extracts of wounded or MeJA treated plants were used (not shown).

The purified OPR3-MBP fusion protein or the factor Xa cleaved OPR3 were used in experiments to measure some of their properties as β -NADPH-dependent oxidoreductase. We found that both the cleaved OPR3 and the OPR3-MBP fusion were capable of oxidising β -NADPH in the presence of different substrates, with no significant differences in the rate of β -NADPH oxidation of the substrates. Therefore, assays presented here were carried out using the cleaved OPR3.

The first substrate candidate for the recombinant protein was OPDA. Figure 6A shows that purified OPR3 significantly decreased β -NADPH concentration when micromolar amounts of OPDA (9S,13S-cis isomer) was used as substrate. The decrease in β -NADPH concentration was dependent on the presence of both the recombinant protein and OPDA in the reaction.

β -NADPH oxidation activity was also observed when an OPDA analogue, the 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 (PGJ2), a ligand of the nuclear receptor PPAR γ for adipocyte differentiation (Kliwer *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1995), was used as substrate. Purified OPR3 substantially decreased β -NADPH concentration in the presence of micromolar amounts of PGJ2 within an hour, and the reduction in β -NADPH concentration was as well dependent on the presence of both protein and PGJ2 (Figure 6B). Oxidation of β -NADPH could not be measured when MeJA (cis isomer), which lacks the double bond in the ketone ring, was used as substrate (Figure 6C), even when used at millimolar amounts (not shown).

To further evaluate the specificity of the reductase activity of OPR3, assays were carried out using simpler molecules, cyclohexenone and cyclohexanone, as electron acceptors. Cyclohexenone has been shown to serve as substrate for OYE (Vaz *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1998) and OPR (Schaller and Weiler, 1997a). As expected, the recombinant OPR3 significantly decreased β -NADPH concentration in the presence of cyclohexenone, but not cyclohexanone (Figure 7). This supports the idea that the specificity of the enzyme is the cleavage of olefinic bounds in cyclic enones.

The rate of β -NADPH oxidation observed with 0.1 mM cyclohexenone was however lower than the

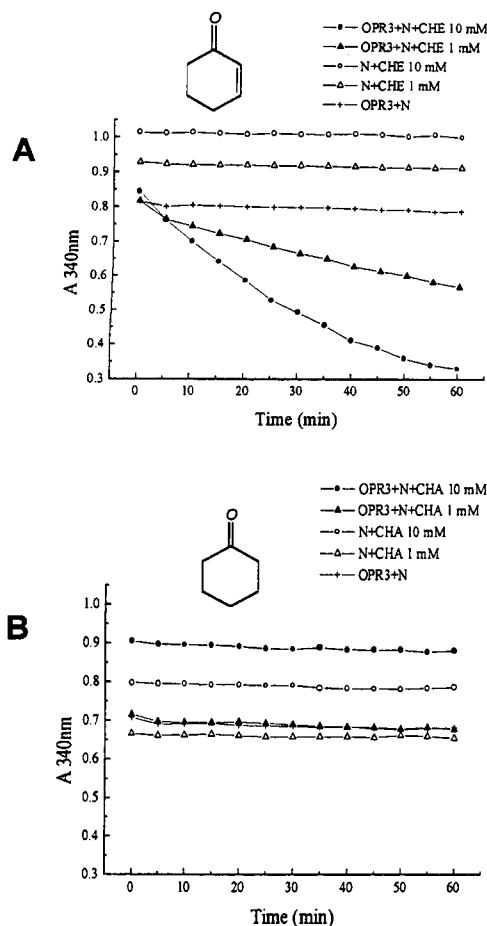


Figure 7. β -NADPH oxidation activities of the recombinant OPR3 over cyclohexenone (CHE, A) and cyclohexanone (CHA, B). Assays were performed aerobically, at 25°C, in 1 mL of 50 mM potassium phosphate, pH 7.5, buffer containing 120 μ M β -NADPH (N), 1 μ g of the purified protein and 1 mM or 10 mM of the substrates.

rates measured with OPDA and PGJ2 at the same concentration. Higher rates of enzyme activity were measured when cyclohexenone at 1 and 10 mM were used (Figure 7). Differences in activity rates observed for different substrates were interpreted as a consequence of the specificity of OPR3 for each substrate or it may reflect differences in solubility of these compounds in aqueous solution at particular pHs.

OPR3 oxidoreductase activity with the above substrates was also detected when β -NADH or α -NADH were used as co-substrates, however, the rates of reactions were, on average, twenty times lower than that observed with β -NADPH (not shown). The enzyme was also active on a broad range of pH, from 5.0 to

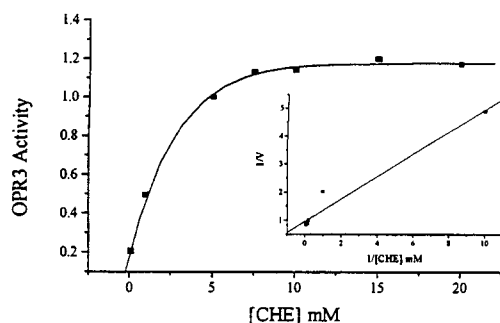
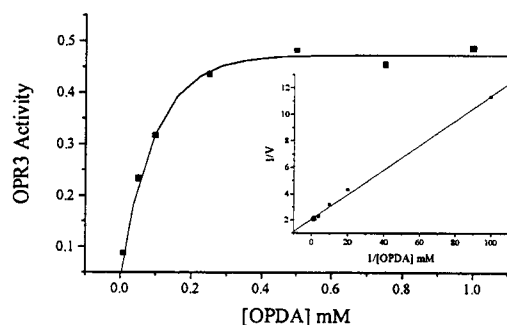


Figure 8. Determination of V_{max} and K_m values of the recombinant OPR3 for OPDA and cyclohexenone. Assays were performed as described above varying the concentration of the substrates. OPR3 activities (nmol NADPH min⁻¹ μg⁻¹ protein) were measured calculating the rates of reactions with different substrate concentrations during the linear phase of the reaction. K_m values, 45 μM for OPDA and 2.5 mM for CHE were determined by the fitted curves of the inlet graphics.

8.5, with little variation in activity rates. This was consistent with the enzyme preference to hydrogen donor and pH optimum observed for the corn OPR (Vick and Zimmerman, 1986).

The rate of the β-NADPH oxidation activity differed with type and concentration of substrates

The K_m and V_{max} values of the OPR3 protein for OPDA and cyclohexenone were calculated by measuring the rate of β-NADPH consumption with different substrate concentrations (Figure 8). The estimated K_m for *cis*-OPDA was 45 μM, and 2.5 mM for cyclo

hexenone, indicating a higher affinity of the OPR3 protein to OPDA. This was consistent with values of K_m determined for *C. sempervirens* OPR for the same substrate at similar conditions (Schaller and Weiler, 1997b). Estimation of K_m and V_{max} values for PGJ2 was not possible using the spectrophotometric measurements because PGJ2 shows high absorbances at 340 nm at micromolar concentrations (not shown).

Discussion

The data presented provide evidence that the *Arabidopsis* gene *OPR3* is functionally homologous to the flavoprotein reductases OPRs and OYEs. *OPR3* is rapidly induced after wounding and requires the *COI1* function for its full expression. The purified recombinant OPR3 protein cross-reacted with antibodies against OYEs and showed oxidation of β-NADPH when OPDA, cyclohexenone and prostaglandin PGJ2 were used as substrates. This was consistent with the properties described for OYEs and OPRs over cyclic enones.

Although the resulting products of the reactions done with OPDA and PGJ2 were not characterised, it is assumed that the reductase activity of the recombinant protein is directed to the olefinic bound of the ketone ring. Several lines of evidence indicate that this is probably the case. Firstly, it has been demonstrated by derivatization, GC/MS and NMR analysis that the reaction product of OPRs from *Arabidopsis* (Schaller and Weiler, 1997a) and *Corydalis sempervirens* (Schaller and Weiler, 1997b) is the 3-oxo-2(2'[Z]-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid (OPC-8:0). Lack of enzyme activity over MeJA indicates that the double bound in the aliphatic side chain, which is located in the same position in both MeJA and OPDA, is not the one that is attacked in the reaction. In addition, the OYE NADPH-dependent reduction of olefinic bounds of α-β-unsaturated carbonyl compounds is limited to aldehydes and ketones (Vaz *et al.*, 1995). The NADPH-dependent reductase activity of OPR3 over cyclohexenone, but not cyclohexanone, clearly shows the specificity of the enzyme towards cleavage of olefinic bounds in cyclic enones.

The estimated specific reductase activity of OPR3 for cyclohexenone (60 mol β-NADPH per minute per mole protein) was equivalent to activities described for OYEs (Stott *et al.*, 1993). However, OPR3 showed a much higher K_m for cyclohexenone than OYE1 (Brown *et al.*, 1998; Niino *et al.*, 1995). An inter-

pretation to account for this difference may be an amino acid change in the corresponding catalytic site of OPR3. The crystal structure of OYE1 revealed that His191 and Asn194 are the residues that bind hydrogen to phenolic ligands (Fox and Karplus, 1994). These residues are also predicted to interact with NADPH in the active site and in hydride transfer reactions with α - β -unsaturated enones (Brown *et al.*, 1998; Karplus *et al.*, 1995). Mutations of His191 to Asn, and Asn194 to His significantly diminished the binding activity to phenolics and decreased the reactivity of OYE1 to cyclohexenone (Brown *et al.*, 1998). Mutated OYE1 having either Asn191 or Asn191 and His194 showed K_m values for cyclohexenone around 10 mM or higher (Brown *et al.*, 1998). Notably, OPR3 has a His residue corresponding to Asn194 of OYE1 (Figure 4), and this may contribute to its higher K_m for cyclohexenone.

OYE is a homodimeric protein with one molecule of flavin per monomer. In addition to NADPH and NADH, OYE can bind several ligands including phenols and a number of steroids, such as β -estradiol and testosterone (Vaz, *et al.*, 1995). Other flavoproteins homologous to OYE, particularly the estrogen-binding protein from *Candida albicans* (CaEBP1) and the bacterial morphinone reductase show oxidoreductase properties similar to OYEs (Madani *et al.*, 1994; French and Bruce, 1994). The oxidoreductase activity of CaEBP1 and morphinone reductase over cyclohexenone is inhibited by β -estradiol and progesterone, respectively (Madani *et al.*, 1994; French and Bruce, 1994). In the case of morphinone reductase, progesterone was a strong competitive inhibitor (French and Bruce, 1994). Our data indicate that the OPR3 protein presents structure/activity very similar to these flavo-enzymes. We therefore tested the β -NADPH-dependent oxidoreductase activity of OPR3 in the presence of steroids, including testosterone, progesterone and β -estradiol. A very small but significant oxidoreductase activity with β -estradiol has been detected in micromolar quantities (C. L. Costa and C. E. Benedetti, unpublished). However, even in equimolar quantities of the substrate and steroid, we observed no statistically significant inhibitory effect of progesterone or β -estradiol on the rate of β -NADPH oxidase (unpublished results). Work is in progress to better evaluate a possible interaction of OPR3 with steroids. However, the possibility that β -estradiol is reduced by OPR3 is of particular relevance, because it suggests that plant steroids may be substrates or may modulate the activity of the enzyme.

The octadecanoids precursors of JA, particularly OPDA and dinor-OPDA have been shown to possess their own biological activity as signals and modulators of gene expression (Parchmann *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1997; Koch *et al.*, 1999; Stelmach *et al.*, 1999). OPR3 is induced rapidly and transiently after wounding and is up-regulated by MeJA. Accordingly, both lipoxygenase (LOX) and allene oxide synthase (AOS), which catalyses the formation of intermediates precursors of OPDA, are also transiently induced after wounding or by MeJA treatment in Arabidopsis leaves (Bell and Mullet, 1993; Laudert and Weiler, 1998). It is likely that the OPR3 gene is co-ordinately regulated in the pathway to convert increased pools of OPDA formed in response to wounding. It would follow that increased activity of OPR3 would result in higher levels of JA in the wounded area. In this respect, accumulation of OPR3 transcripts were not observed in unwounded leaves in the vicinity of wounded sites (C. L. Costa and C. E. Benedetti, unpublished). This suggests that OPR3 is primarily involved in the local response to wounding. In contrast, the Arabidopsis OPR1 and OPR2 are predominantly expressed in roots, where OPR3 is poorly expressed, and are induced locally and systemically after wounding (Biesgen and Weiler, 1999). This shows the existence of tissue-specific regulation of OPRs and suggests different roles for these enzymes in response to wounding or in their activities. Accordingly, it has been shown that two isoforms of OPRs from *C. sempervirens* display different stereospecificity to different OPDA stereoisomers (Schaller *et al.*, 1998).

Levels of OPR3 transcripts are relatively low in unwounded tissues. This may explain why we were unable to detect the protein in plant tissues. Even after induction with MeJA, native OPR3 protein could not be detected by the OYE antiserum. It is possible that native OPR3 protein does not accumulate at same extent as the corresponding transcript alternatively, native OPR3 may differ slightly from the recombinant protein in its structure, and thus it may not be recognized by the antiserum.

Evidence is presented that PGJ2, a ligand of a mammalian nuclear receptor and analogue of OPDA, is reduced by OPR3. This strengthens the evidence for structural and functional parallels between jasmonates and prostaglandins (Berger *et al.*, 1996). Interestingly, novel prostaglandin-like compounds with biological activity, the isoprostenes, have recently been found in plants (Mueller, 1998; Parchmann and Mueller, 1998).

Acknowledgements

We thank Dr. John G. Turner for the *Arabidopsis coi1* seeds, Dr. Elliot M. Meyerowitz for providing the *Arabidopsis* cDNA library, and Dr. Vincent Massey, for sending the antibodies against the OYE2 and OYE3 proteins. This work was supported by grants (95/6662-5) from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). C.L.C. and C.E.B. received fellowships from FAPESP (98/00881-5 and 97/0917-7, respectively).

References

- Ausubel, F.M. Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. Smith, J.A. and Struhl, K. 1998. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley, New York.
- Baldwin, I.T. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8113-8118.
- Bell, E. and Mullet, J.E. 1993. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* 103: 1133-1137.
- Benedetti, C.E., Costa, C.L., Turcinelli, S.R. and Arruda, P. 1998. Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *coi1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 1037-1042.
- Bergey, D.R., Howe, G.A. and Ryan, C. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12053-12058.
- Biesgen, C. and Weiler, E.W. 1999. Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 208: 155-165.
- Brown, B.J., Deng, Z., Karplus, P.A. and Massey, V. 1998. On the active site of old yellow enzyme. Role of histidine 191 and asparagine 194. *J. Biol. Chem.* 273: 32753-32762.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L. and Mullet, J.E. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Sci. USA* 89: 4938-4941.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E. 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9: 1211-1223.
- Farmer, E.F. and Ryan, C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. and Turner, J.G. 1994. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6: 751-759.
- Forman, B.M., Tontoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. and Evans, R.M. 1995. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83: 803-812.
- Fox, K.M. and Karplus, P.A. 1994. Old yellow enzyme at 2 Å resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. *Structure* 2: 1089-1105.
- French, C.E. and Bruce, N.C. 1994. Purification and characterization of morphinone reductase from *Pseudomonas putida* M10. *Biochem. J.* 301: 97-103.
- French, C.E. and Bruce, N.C. 1995. Bacterial morphinone reductase is related to old yellow enzyme. *Biochem. J.* 312: 671-678.
- Howe, G.A., Lightner, J., Brwose, J. and Ryan, C.A. 1996. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8: 2067-2077.
- Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Terao, T. and Shinozaki, K. 1996. Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNAs and analysis of the expression of the corresponding genes. *Plant Cell Physiol.* 37: 1073-1082.
- Karplus, P.A., Fox, K.M. and Massey, V. 1995. Structure-function relations for old yellow enzyme. *FASEB J.* 9: 1518-1526.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Wilson, T.M., Patel, I., Morris, D. C. and Lehmann, J.M. 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819.
- Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J. and Boland, W. 1999. Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol.* 121: 153-162.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laudert, D. and Weiler, E.W. 1998. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 15: 675-684.
- Liang, P. and Pardee, A.B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Madani, N.D., Malloy, P.J., Rodriguez-Pombo, P., Krishnan, A.V. and Feldman, D. 1994. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 922-926.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. and Browne, J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Sci. USA* 94: 5473-5477.
- Menke, F.L.H., Parchmann, S., Mueller, M.J., Kijne, J.W. and Memelink, J. 1999. Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 119: 1289-1296.
- Mueller, M.J. 1998. Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chem. Biol.* 5: 323-333.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 493-497.
- Niino, Y.S., Chakraborty, S., Brown, B.J. and Massey, V. 1995. A new old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 1983-1991.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. and Bowles, D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.
- Parchmann, S., Gundlach, H. and Mueller, M.J. 1997. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* 115: 1057-1064.
- Parchmann, S. and Mueller, M.J. 1998. Evidence for the formation of dinor isoprostanes E-1 from α -linolenic acid in plants. *J. Biol. Chem.* 273: 32650-32655.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.-P. and Broekaert, W.F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 2103-2113.

- Rojas, E., Titarenko, E., León, J., Berger, S., Vancanneyt, G. and Sánchez-Serrano, J.J. 1998. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 13: 153-165
- Saito, K., Thiele, D.J., Davio, M., Lockridge, O. and Massey, V. 1991. The cloning and expression of a gene encoding old yellow enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* 266: 20720-20724
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schaller, F., Hennig, P. and Weiler, E.W. 1998. 12-Oxophytodienoate-10,11-reductase: occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid. *Plant Physiol.* 118: 1345-1351
- Schaller, F. and Weiler, E.W. 1997a. Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 272: 28066-28072
- Schaller, F. and Weiler, E.W. 1997b. Enzymes of the octadecanoid biosynthesis in plants 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *Eur. J. Biochem.* 245: 294-299
- Snape, J.R., Walkley, N.A., Morby, A.P., Nicklin, S. and White, G.F. 1997. Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter*. *J. Bacteriol.* 179: 7796-7802
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y. and Lehman, C.C. 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 15: 747-754
- Stelmach, B.A., Muller, A. and Weiler, E.W. 1999. 12-oxo-phytodienoic acid and indole-3-acetic acid in jasmonic acid-treated tendrils of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* 51: 187-192
- Stott, K., Saito, K., Thiele, D.J. and Massey, V. 1993. Old yellow enzyme: the discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 6097-6106
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. 1998. Separated jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Sci. USA* 95: 15107-15111
- Titarenko, E., Rojas, E., León, J. and Sánchez-Serrano, J.J. 1997. Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115: 817-826
- Vaz, A.D.N., Chakraborty, S. and Massey, V. 1995. Old yellow enzyme: Aromatization of cyclic enones and the mechanism of a novel dismutation reaction. *Biochemistry* 34: 4246-4256
- Vervoerd, T.C., Dekker B.M.M. and Hoekema A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17: 2362
- Vick, B.A. and Zimmerman, D.C. 1986. Characterization of 12-oxo-phytodienoic acid reductase in corn. *Plant Physiol.* 80: 202-205
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J. and Browse, J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7209-7214
- Weber, H., Vick, B.A. and Farmer, E.E. 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10473-10478
- Xie, D.-X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J.G. 1998. COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094
- Xu, Y., Chang, P.-F. L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077-1085

Discussão¹

Nas últimas décadas, AJ e MeJA foram reconhecidos como compostos reguladores de desenvolvimento de plantas capazes de agirem também como sinalizadores em resposta a estresse (Creelman e Mullet, 1997; Wasternack e Parthier, 1997). Baseados na via de biossíntese desses compostos, elucidada por Vick e Zimmerman (1983) (Fig. 1), uma via de sinalização em resposta à injúria mecânica foi proposta como sendo iniciada pela ação de lipases de membrana cuja atividade sobre a membrana celular resultaria na produção de ácido linolênico, composto inicial da via de biossíntese de jasmonatos (Farmer e Ryan, 1992).

Compostos intermediários desta via como OPDA e dinor-OPDA, assim como coronatina, uma fitotoxina produzida por várias linhagens de *Pseudomonas syringae* e cuja estrutura molecular é bastante similar a OPDA, são capazes de ativar a transcrição de genes em resposta a ferimento (Weiler *et al.*, 1994; Kutchan, 1993). Além disso, vários aminoácidos conjugados a AJ e seus análogos sintéticos foram ativos nesta cascata de sinalização (Kramell *et al.*, 1997; Krumm *et al.*, 1995), mostrando a diversidade de compostos que podem estar envolvidos na via de transdução de sinal em resposta à injúria mecânica (Wasternack *et al.*, 1998).

Kramell e colaboradores (2000) mostraram que em cevada há dois conjuntos distintos de genes expressos em resposta a AJ. Um deles, composto por *JIP6*, *JIP23*, *JIP37*, *JIP60* (*jasmonate induced proteins*) e *JRG1* (*jasmonate-responsive genes*) é induzido em plantas submetidas a tratamentos com AJ, OPDA, coronatina e por estresse osmótico

¹ O artigo apresenta uma ampla discussão dos resultados. Assim, esta sessão constará de uma discussão geral onde se aborda outros aspectos da contribuição deste trabalho para o entendimento das vias de sinalização em resposta a ferimento em *Arabidopsis*.

induzido por sorbitol. O outro conjunto de genes, composto por *JRG5*, *JRG10*, *JRG12* (*jasmonate responsive genes*) e *LOX2* (*lipoxygenase 2*) é expresso em resposta ao tratamento com jasmonatos ou coronatina, mas não são expressos em decorrência do acúmulo de AJ e OPDA após estresse osmótico. Assim, a aplicação de AJ e OPDA e o acúmulo destes mesmos compostos em respostas a estresse ambiental provavelmente induzem a transcrição de conjuntos distintos de genes em cevada. Esse trabalho demonstrou também que a aplicação de OPDA, AJ ou coronatina não contribuem para o aumento da concentração endógena de AJ (Kramell *et al.*, 2000).

Em *Arabidopsis* foi demonstrado que a injúria mecânica e tratamentos com jasmonatos em plantas não machucadas induzem a transcrição de genes de defesa (Parchmann *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1997; Stelmach *et al.*, 1999). Contudo, os genes induzidos por ferimento em plantas selvagem e mutantes *coi1* indicaram que há duas vias distintas de sinalização. Uma delas não envolve AJ como mediador e é responsável pela indução de genes com provável função de recuperação do tecido lesado, enquanto a outra requer a percepção de AJ e ativa genes envolvidos tanto em resposta local como sistêmica (Titarenko *et al.*, 1997, Rojo *et al.*, 1998).

Esses estudos mostram portanto que as vias de sinalização em resposta a ferimento ou estresse ambiental podem diferir em seus sinalizadores e resultar na expressão de diferentes conjuntos de genes de defesa.

Esta pesquisa de mestrado apresenta evidências da existência de uma terceira isoforma dos genes *OPR1* e *OPR2* (12-oxofitodienoato redutases 1 e 2) de *Arabidopsis* responsável pela conversão de OPDA em OPC8:0, na via de biossíntese de ácido jasmônico (Schaller e Weiler, 1997a).

O gene *OPR3* é rapidamente expresso após ferimento ou tratamento com MeJA em plantas selvagem, padrão de indução também observado para lipoxigenase e aleno óxido sintase, que catalisam a formação de compostos precursores de OPDA em folhas de *Arabidopsis* (Laudert e Weiler, 1998; Bell e Mullet, 1993). Diferentemente dos genes *OPR1* e *OPR2*, *OPR3* apresenta níveis de expressão baixo em raízes (Biesgen e Weiler, 1999), o que pode sugerir que a proteína OPR3 tenha sua função associada a cloroplastos, assim como ocorre com vários genes induzidos por AJ (Reinbothe *et al.*, 1994).

Em experimentos ainda não publicados pudemos observar que o gene *OPR3* é induzido apenas em folhas machucadas e não sistemicamente. Isto sugere que OPR3 seja responsável por um aumento nos níveis de OPC8:0 e consequentemente de AJ no local do ferimento logo após o dano celular.

Estudos de cinética enzimática mostraram que proteína OPR3 recombinante é capaz de oxidar β -NADPH na presença dos compostos ciclohexenona, 12-OPDA e PGJ2, compostos que possuem uma insaturação no anel cetônico de suas moléculas. Esses dados estão de acordo com a atividade anteriormente descrita para as proteínas OYEs (*old yellow enzymes*) e OPRs (Schaller e Weiler, 1997a e 1997b). A ausência de atividade da proteína recombinante OPR3 sobre MeJA e ciclohexanona indica que ligações duplas na cadeia alifática desses compostos não são reduzidas por OPR3, mostrando assim a especificidade da enzima por clivar ligações duplas dos anéis cetônicos de seus substratos.

Como pode ser observado na figura 2, a via de sinalização de resposta à injúria mecânica é mediada por uma via octadecanóica análoga ao mecanismo de sinalização de processos inflamatórios em mamíferos que resulta na produção de prostaglandinas e leucotrienos. Como esses compostos apresentam estrutura molecular bastante semelhante

ao OPDA (Mueller, 1997), o composto PGJ2 foi utilizado como substrato em ensaios de cinética enzimática.

Os Isoprostanos são produzidos a partir da oxidação de ácido aracdônico e apresentam importante papel em inúmeros processos biológicos em mamíferos. Em 1998, Parchmann e Mueller apresentaram evidências da produção de isoprostanos a partir de ácido linolênico em diversas espécies de plantas, estreitando o paralelo existente entre vias de sinalização em resposta a estresse em plantas e mamíferos (Parchmann e Mueller, 1998)

A proteína OYE é capaz de ligar-se a vários compostos incluindo esteróides, como β -estradiol e testosterona (Vaz *et al.*, 1995). Proteínas *estrogen-binding* de *Candida albicans* (CaEBP1) e morfinona redutase de *Agrobacterium radiobacter* apresentam propriedades semelhantes a OYEs (Madani *et al.*, 1994; French e Bruce, 1994). A atividade dessas enzimas sobre ciclohexenona é inibida por β -estradiol e progesterona, respectivamente (Madani *et al.*, 1994; French e Bruce, 1994).

Em estudos iniciais utilizando esteróides pudemos identificar atividade de OPR3 sobre β -estradiol (dados não mostrados). A possibilidade de β -estradiol ser reduzido por OPR3 indicaria que esteróides de plantas poderiam modular a atividade de OPR3. Durante a redação desta tese, Schaller e colaboradores mostraram que a proteína OPR3 de *Arabidopsis* é induzida por brassinoesteróides (esteróides moduladores do crescimento de plantas) porém, a atividade óxido-redutase da proteína OPR3 sobre tais esteróides ainda não foi demonstrada (Schaller *et al.*, 2000). Além disso, foi demonstrado que OPR3 converte OPDA em OPC 8:0 com maior eficiência que as isoformas OPR1 e OPR2 anteriormente descritas indicando a importância da proteína OPR3 na via de biossíntese de AJ e conseqüentemente para o mecanismo de sinalização em resposta a estresse em

Arabidopsis (Schaller et al., 2000)

Enquanto esta tese era redigida, Stintzi e Browse (2000) publicaram um artigo onde descrevem a caracterização de um novo mutante macho-estéril de *Arabidopsis*, isolado com o objetivo de investigar o papel dos jasmonatos no processo de desenvolvimento de anteras e grãos de pólen. A clonagem do *locus* mutante indicou que este correspondia ao gene que codifica a proteína OPR3. O fenótipo das plantas mutantes *opr3* pode ser revertido por tratamento com AJ, mas não por OPDA. Com os resultados obtidos os autores sugerem que AJ é a molécula sinalizadora que garante a produção e desenvolvimento de grãos de pólen férteis. Além de demonstrarem também que a enzima OPR3 é a única isoforma de OPDA redutase capaz de reduzir o esteroisômero correto para a produção de AJ, composto necessário para o desenvolvimento normal do gametofito masculino em *Arabidopsis* (Stintzi e Browse, 2000). Um segundo mutante de *Arabidopsis thaliana* macho estéril, também obtido por inserção de T-DNA foi isolado por Sanders e colaboradores (2000). O mutante denominado *deleyed dehiscence1*, apresenta uma deficiência no processo de deiscência da antera e o pólen é mantido na antera impedindo assim a polinização. A clonagem do *locus* mutante mostrou a interrupção do gene que codifica a enzima 12-oxidofitodienoato redutase. Assim como observado com o mutante *opr3* a macho esterilidade do mutante *deleyed dehiscence1* pode ser revertida por tratamento com AJ. Os experimentos realizados com os mutantes *opr3* e *deleyed dehiscence1* sugerem que AJ é importante para determinar o tempo de deiscência e o desenvolvimento normal das anteras em *Arabidopsis*.

Os resultados obtidos nesta pesquisa de mestrado nos permitiram a elaboração de duas hipóteses que podem explicar a interação entre a proteína COI1 e a expressão do gene *OPR3* (Fig. 4).

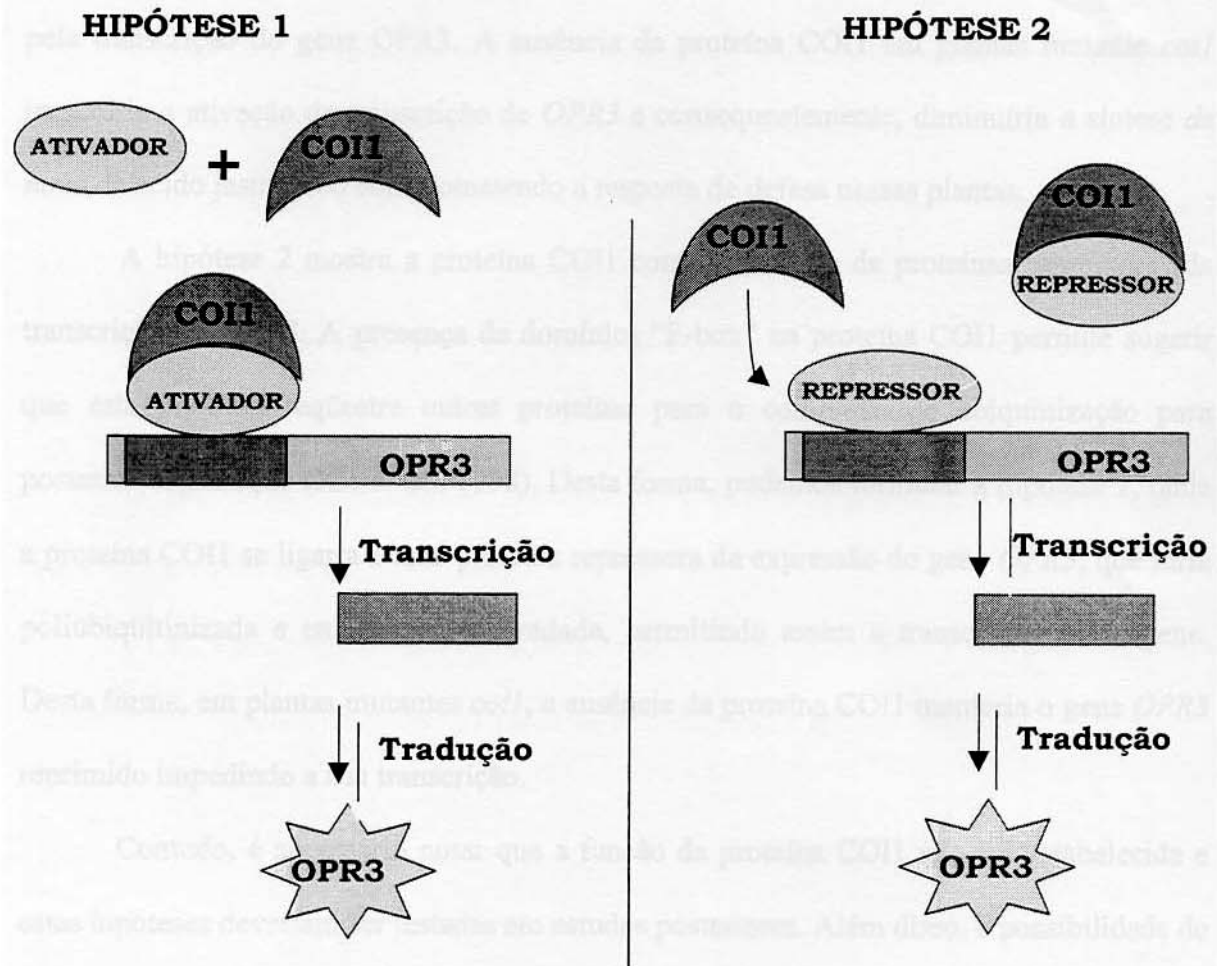


Figura 4: Estes diagramas representam duas hipóteses possíveis para descrever a correlação entre a proteína COI1 e a expressão do gene *OPR3*. As duas hipóteses propostas assumem que a proteína COI1 seja responsável pela interação com outras proteínas ativadoras (hipótese 1) ou repressoras (hipótese 2) de transcrição de genes de defesa devido a presença de domínios repetitivos ricos em leucina encontrados ao longo da sequência que codifica a proteína COI1.

A hipótese 1 mostra a proteína COI1 interagindo com uma proteína ativadora da expressão do gene *OPR3*. Sugere-se aqui que a proteína COI1, expressa normalmente em plantas de *Arabidopsis* selvagem, interaja com uma proteína ativadora que seja responsável pela transcrição do gene *OPR3*. A ausência da proteína COI1 em plantas mutante *coi1* impediria a ativação da transcrição de *OPR3* e consequentemente, diminuiria a síntese *de novo* de ácido jasmônico comprometendo a resposta de defesa nessas plantas.

A hipótese 2 mostra a proteína COI1 como captadora de proteínas repressoras da transcrição de *OPR3*. A presença de domínios “F-box” na proteína COI1 permite sugerir que esta proteína seqüestre outras proteínas para o complexo de ubiquinização para posterior degradação (Xie *et al.*, 1998). Desta forma, pudemos formular a hipótese 2, onde a proteína COI1 se ligaria a uma proteína repressora da expressão do gene *OPR3*, que seria poliubiquitinizada e em seguida degradada, permitindo assim a transcrição desse gene. Desta forma, em plantas mutantes *coi1*, a ausência da proteína COI1 manteria o gene *OPR3* reprimido impedindo a sua transcrição.

Contudo, é necessário notar que a função da proteína COI1 não foi estabelecida e estas hipóteses deveriam ser testadas em estudos posteriores. Além disso, a possibilidade de que a proteína COI1 seja um receptor de ácido jasmônico ainda não foi descartada.

Conclusões

O gene *OPR3* é induzido por injúria mecânica e tratamento com metil jasmonato em plantas de *Arabidopsis* selvagem e em menores níveis em plantas mutante *coil*, sugerindo a necessidade da função *COI1* para sua completa expressão. No Anexo I são apresentadas duas hipótese que podem explicar a interação entre as proteínas COI1 e OPR3.

A expressão do gene OPR3 é regulada de maneira diferenciada em folhas e raízes de plantas selvagem.

O gene *OPR3* apresenta alta identidade com flavoproteínas β -NADPH-dependentes como OYE, OPR1 e OPR2.

Ensaio de cinética enzimática demonstram a especificidade da proteína OPR3 em oxidar duplas ligações em anéis cetônicos de seus substratos em presença de β -NADPH.

Referências Bibliográficas

- Baron, C. e Zambrysk, P.C.** (1995) The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? *Annu. Rev. Genetic.*, **29**, 1027-1029
- Bell, E. e Mullet, J.E.** (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.*, **103**, 1133-1137
- Benedetti, C.E., Costa, C.L., Turcinelli, S.R., Arruda, P.** (1998) Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *coil* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **116**, 1037-1042
- Benedetti C.E., Xie D., Turner J.G.** (1995) COI-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, **109**, 567-572
- Bergey, D.R., Ryan, C.A.** (1999) Wound-and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 815-823
- Bergey, D.R., Howe, G.A. and Ryan, C.** (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12053-12058
- Biesgen, C. and Weiler, E.W.** (1999) Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **208**, 155-165

- Birkenmeier, G.F. e Ryan, C.A.** (1998) Wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol.*, **117**, 687-693
- Bögre, O., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N.S., Hirt, H.** (1997) Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell*, **9** 75-83
- Bögre, O., Ligterink, W., Heberle-Bors, E., Hirt, H.** (1996) Mechanosensors in plants. *Nature*, **383**, 489-490
- Bowles, D.J.** (1993) Local and systemic signals in the wound response. *Semin. Cell Biol.*, **103-111**
- Bowles, D.J.** (1991) The wound response of plants. *Curr. Biol.* **1**, 165-167
- Capella, A.N., Teixeira, M.M., Arruda, P., Benedetti, C.E.** *COII* affects myrosinase activities and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding-proteins in *Arabidopsis*. *Submetido para publicação*.
- Chang, C.** (1996) The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm? *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 129-133
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A., Ryan, C.A.** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.*, **111**, 797-803

- Creelman, R.A e Mullet, J.E.** (1997) Oligossacharins, brassionolides and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. *Plant Cell*, **9**, 1211-1223
- Creelman, R.A e Mullet, J.E.** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4114-4119
- Ellard-Ivery, M. e Douglas, C.J.** (1996) Role of jasmonates in the elicitor -and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, **112**, 183-192
- Farmer, E.F. and Ryan, C.A.** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, **4**, 129-134
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. and Turner, J.G.** (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, **6**, 751-759
- French, C.E. and Bruce, N.C.** (1994) Purification and characterization of morphinone reductase from *Pseudomonas putida* M10. *Biochem J.*, **301**, 97-103
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H.** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2389-2393

- Hause, B., Demus, U., Teichmann, C., Parthier, B., Wasternack, C** (1996) Development and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley. *Plant Cell Physiol.*, **37** 641-649
- Herde, O., Atzorn, R., Fisahn, J., Wasternack, C., Willmitzer, L., Peña-Cortés, H.** (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid- deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* **112** 853-860
- Hirt, H.** (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **2**, 11-15
- Hobbie, L., Timpte, C., Estelle, M.** (1994) Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant. Mol. Biol.* **26**, 1499-1519
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Hirt, H.** (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11274-11279
- Kakimoto, T.** (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, **274**, 982-985
- Kieber, J.J., Rothemberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., Ecker, J.R.** (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinase. *Cell*, **72**, 427-441.

- Kramell, R., Mierch, O., Atzorn, R., Parthier, B., Wasternack, C.** (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the “oxylipin signature” in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol.* **123**, 177-187
- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B. e Wasternack, C.** (1997) Amino acid conjugates of jasmonic acid induces jasmonate-responsive-genes expression in barley leaves. *FEBS Lett.* **414**, 197-202
- Krumm, T., Bademer, K. e Boland, W.** (1995) Introduction of a volatile biosynthesis in the Lima bean by leucine and isoleucine conjugates of 1-oxo-and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoic pathway. *FEBS Lett.* **377**, 523-529
- Kutchan, T. M.,** (1993) 12-Oxo phytodienoic acid induces accumulation of berberine bridge enzyme transcripts in a manner analogous to methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* **142**, 502-505
- Lamb, C. e Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275
- Laudert, D. and Weiler, E.W.** (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* **15**, 675-684
- Lehmann, J., Atzorn, R., Brückner, C., Reiboth, S., Leopold, J., Wasternack, C., Parthier, B.** (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed leaf segments. *Planta*, **197**, 156-162

- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P., Guerrier, D., Chefdor, F., Giraudat, J.** (1994) *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-regulated protein phosphatase. *Science*, **264**, 1448-1452
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593
- Low, P.S. e Merida, J.R.** (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant.*, **96**, 533-542
- Madani, N.D., Malloy, P.J., Rodriguez-Pombo, P., Krishnan, A.V. and Feldman, D.** (1994) *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 922-926
- Malone, M.** (1992) Kinetics of wound-induced hydraulic signals and variation potentials in wheat seedlings. *Planta*, **187**, 505-510
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. and Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Sci. USA*, **94**, 5473-5477
- McConn, M., e Browse, J.** (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell*, **8**, 403-416
- Meyer, K., Leube, M.P., Grill, E.** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **264**, 1452-1455
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Shinozaki, K.** (1997) Environmental stress response in plants: The role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol.*, **15**, 15-19

- Moyen, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., Knight, M.R., Johannes, E.** (1998) Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyllo cells: Ca^{2+} mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Envir.*, **21**, 1101-1111
- Mueller, M.J.** (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Phisiol. Plant.*, **100**, 653-663
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. and Bowles, D.J.** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, **274**, 1914-1917
- Parchmann, S. and Mueller, M.J.** (1998) Evidence for the formation of dinor isoprostanes E-1 from alfa-linolenic acid in plants. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32650-32655
- Parchmann, S., Gundlach, H. and Mueller, M.J.** (1997) Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.*, **115**, 1057-1064
- Peña-Cortés, H.** (1996) Absciscic acid-deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemin treatment. *Planta*, **198**, 447-451
- Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiller, E.W. e Willmitzer, L.** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, **191**, 123-128

- Peña-Cortés, H., Sanches-Serrano, J.J., Mertens, R., Willmitzer, L. e Prat, S. (1989)**
Absciscic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9851-9855
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.-P., Broekaert, W.F. (1998)** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 2103-2113
- Qui, Z.-H., Gijon, M.A., de Carvalho, M.S., Spencer, D.M., Leslie, C.C. (1998)** The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**, 8203-8211
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B. e Reinbothe, C. (1994)** JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonate in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell*, **6**, 1197-1209
- Rojo, E., Titarenko, E., León, J., Berger, S., Vancanneyt, G. and Sánchez-Serrano, J.J. (1998)** Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and – independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**, 153-165
- Ryan, C.A. (1990)** Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **28**, 425-449
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., Weiler, E.W. (2000)** 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*, **210**, 979-984

- Schaller, F. e Weiler, E.W.** (1997a) Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28066-28072
- Schaller, F. e Weiler, E.W.** (1997b) Enzymes of the octadecanoid biosynthesis in plants 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 294-299
- Schaller, A. e Ryan, C.A.** (1995) Sistemin – a polypeptide defense signal in plants. *BioEssays*, **18**, 27-33
- Seo, S., Sano, H., Ohashi, Y.** (1999) Jasmonate-based wound transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, **11**, 289-298
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., Ohashi, Y.** (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science*, **270**, 1988-1991
- Shulaev, V., Léon, J., Raskin, I.** (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell*, **7**, 1691-1701
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., Harper, J.W.** (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, **91**, 209-219
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., Lehman, C.C.** (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pithium irregulare*. *Plant J.*, **15**, 747-754

- Staswick, P.E., Wenpei, S., Howell, H.** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6837-6840
- Stelmach, B.A., Muller, A. e Weiler, E.W.** (1999) 12-oxo-phytodienoic acid and indole-3-acetic acid in jasmonic acid-treated tendrils of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry*, **51**, 187-192
- Stintzi, A. e Browse, J.**(2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **97**, 10625-10630
- Suzuki, K. e Shinshi, H.** (1996) Protein kinases in elicitor signal transduction in plant cells. *J. Plant Res.*, **109**, 253-263
- Titarenko, E., Rojo, E., León, J. and Sánchez-Serrano, J.J.** (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**, 817-826
- Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishimama, R. & Machida, Y.** (1995) Cutting activates a 45-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8660-8664
- Vaz, A.D.N., Chakraborty, S. and Massey, V.** (1995) Old yellow enzyme: Aromatization of cyclic enones and the mechanism of a novel dismutation reaction. *Biochemistry*, **34**, 4246-4256

- Vick, B.A. e Zimmermann, D.C.**, (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 470-477
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7209-7214
- Wasternack, C. e Parthier, B.** (1997) Jasmonate-signaled plant gene expression. *Elsevier Science*, **2**, 302-307
- Wasternack, C., Ortel, B., Miersch, O., Kramell, R., Beale, M., Greulich, F., Feussner, I., Hause, B., Krumm, T., Boland, W., Parthier, B** (1998) Diversity in octadecanoid-induced gene expression of tomato. *J. Plant Physiol.*, **152**, 345-352
- Weber, H., Vick, B.A. and Farmer, E.E.** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10473-10478
- Weiler E.W., Kutchan T.M., Gorba T. Brodschelm W., Niesel U., Bublitiz F.** (1994) The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signaling molecules of higher plants. *FEBS Letters*, **345**, 9-13
- Wilton, D.C, Thain, J.F., Minchin, P.E.H., Gubb, I., Reilly, A., Skipper, Y., Doherty, H., O'Donnell, P., Bowles, D.J.** (1992) Electrical signaling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature*, **360**, 62-65

Xie, D.-X, Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J.G. (1998) *COI1*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, **280**, 1091-1094

Xu, Y., Chang, P.-F. L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, **6**, 1077-1085