UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão
papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas

Sabrina Garcia Broetto

Tese de obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão
papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Sabrina Garcia Broetto

Tese de obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Broetto, Sabrina Garcia
B865c Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de
mamão papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases
fúngicas / Sabrina Garcia Broetto. -- São Paulo, 2013.
117p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Frutas tropicais : Ciência dos alimentos 2. Biologia
molecular : Botânica 3. Expressão gênica 4. Mamão : Ciência
dos alimentos I. T. II. Nascimento, João Roberto Oliveira do
orientador.

641.346 CDD

Sabrina Garcia Broetto

Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão
papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Orientador/ presidente

Titulares
Dr. João Paulo Fabi
Profa. Dra. Marília Gaspar
Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi
Prof. Dr. Carlos A. Labate

Suplentes
Prof. Dr. Eduardo Purgatto
Profa. Dra. Beatriz R. Cordenunsi
Profa. Dra. Maria Angela M. de Carvalho
Prof. Dr. Ricardo A. Kluge

São Paulo, maio de 2013

***Talvez não tenhamos conseguido
fazer o melhor, mas lutamos para que o
melhor fosse feito. Não somos o que
deveríamos ser, não somos o que iremos
ser, mas Graças a Deus, não somos o
que éramos.***

(Marthin Luther King)

DEDICATÓRIA

Dedico e agradeço a Deus, Senhor de toda minha vida, da minha fé e Fortaleza dos meus dias;

Aos meus pais, Izanete e Mauricio, que me ensinaram a lutar pelas coisas com muita dignidade, simplicidade e paciência. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão Filiph pelo companheirismo e incentivo;

Aos meus familiares pelo apoio e pelo carinho;

Aos meus maiores e melhores amigos e professores, pelo apoio e pelos ensinamentos;

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, meu orientador, por acreditar em mim, pela paciência, por todos os seus ensinamentos e sua amizade. Obrigada por tudo.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas por me darem condições para desenvolver o meu trabalho da melhor maneira possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, seus professores e funcionários, pela dedicação, pelos ensinamentos e por toda a prestatividade durante esses anos;

Ao Dr. João Paulo Fabi, pelo apoio técnico dispensado;

À Dra. Amanda Francine Asega pela ajuda com os experimentos de indução;

Ao Prof. Dr. John Marcus Labavitch da Universidade da Califórnia, EUA e ao Dr. Gerardo Gutierrez-Sanchez, do Complex Carbohydrate Research Center da Universidade da Georgia, EUA pela gentileza do envio das alíquotas de anticorpos para os testes de expressão heteróloga;

Ao Sr. José Maria Herzog por generosamente disponibilizar as plantas e frutos para a realização deste trabalho;

Às técnicas do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, pelos ensinamentos, prestatividade e pela valiosa colaboração;

Ao Núcleo de Estudos da Fotossíntese, da Universidade Federal do Espírito Santo por permitir o uso do laboratório para processamento e acondicionamento imediato de parte das amostras do experimento;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos na fase inicial deste trabalho (Processo: 142616/2009-5 de 08/2009 a 01/2010);

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2009/53329-4 de 02/2010 a 05/2013).

Por fim, a todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

BROETTO, S.G. **Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas**. 2013. 117 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) presentes na parede celular são capazes de limitar o potencial destrutivo da poligalacturonase (PG) fúngica e, assim, constituem um tipo importante dentre os diversos sistemas de defesa do tecido vegetal frente à infecção fúngica. No mamão, o ataque fitopatogênico é o principal causador de danos pós-colheita, e sua alta susceptibilidade pode estar relacionada com a baixa eficácia ou pouca abundância dos meios de defesa anti-fitopatogênica. Uma vez que isso pode estar relacionado com as PGIPs e nada se conhece sobre o papel dessas proteínas nesse fruto, o objetivo do trabalho foi clonar os genes das PGIPs de mamoeiro e definir seu padrão de expressão em diferentes órgãos e tecidos e ao longo do amadurecimento. Para tanto, foram identificadas no genoma do mamoeiro, a partir de critérios que definem a identidade de uma PGIP, duas prováveis sequências dentre 13 candidatas iniciais. Ambas foram clonadas a partir das sequências genômicas e de cDNA, sequenciadas e sua identidade confirmada, sendo denominadas *Cppgip4* e *Cppgip6*. As análises de expressão relativa em diversos tecidos e idades fisiológicas do mamoeiro demonstraram que os dois genes apresentaram diminuição da expressão com o desenvolvimento dos frutos, sendo que com a polpa apresentou redução dos níveis de expressão relativa de *Cppgip4* em até 18 vezes dos 30 dias pós-antese (DPA) ao 9 dias pós-colheita (DPC). Na casca também houve redução significativa da expressão com o desenvolvimento. Para a expressão absoluta, nos frutos, sementes, caules, raízes e folhas, o número de cópias de ambos os transcritos decresceu com o desenvolvimento, sendo cerca de cem mil vezes mais abundante para *Cppgip6* que para *Cppgip4*. As tentativas de expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris* não geraram resultado positivo, provavelmente em virtude das condições ideais de indução ainda não terem sido estabelecidas corretamente para o ensaio. A atividade de PGIPs extraídas diretamente do tecido foi medida por análise de difusão em ágar empregando pectinase de *Aspergillus niger* e revelou uma tendência à diminuição da porcentagem de inibição à medida que os frutos se desenvolveram, em concordância com os resultados da análise por qPCR. O conjunto de resultados sugere que a expressão varia com o estágio de desenvolvimento do fruto e é tecido-específica, possivelmente em resposta à diferente susceptibilidade dos tecidos ao ataque fitopatogênico, indicando que menores níveis de transcritos e atividade no amadurecimento, período de maior susceptibilidade, poderiam sinalizar para a regulação do processo degradativo marcando o início da senescência.

Palavras-chave: PGIP, clonagem, expressão gênica, fitopatógenos, difusão em ágar.

ABSTRACT

BROETTO, S.G. **Cloning and expression analysis of papaya genes encoding proteins with inhibitory activity against fungal polygalacturonases**. 2013. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) present in plant cell walls are able to inhibit the destructive action of fungal polygalacturonase (PG). In this way, they constitute an important type of plant defense system against fungal infections. In papaya fruit, the pathogenic attack is the main cause of post harvesting loss, and its high susceptibility may be related to the low efficiency or low abundance of anti-phytopathogenic defense. Since this fact could be related to PGIPs expression and little is known about the response of these proteins in the fruit, the aim of the present work was to clone the genes of PGIPs papaya fruit and set their expression pattern in different organs and tissues throughout fruit ripening. Thus, two probable PGIP sequences among 13 initial candidates were identified in the papaya genome by using specific criteria. Both sequences were cloned from cDNA and genomic samples, sequenced and confirmed its identity, and then being named *Cppgip4* and *Cppgip6*. Analysis of relative expression in various tissues at different physiological stages demonstrated that both genes were down regulated during fruit development. The relative expression levels of *Cppgip4* in papaya pulp was reduced by 18 times from the 30 days post-anthesis (DPA) to the 9 days post-harvest (DPH). Similarly, gene expression in papaya peel was significant down regulated during fruit development. Absolute expression analysis revealed gene expressions in the fruit pulp, seed, stem, root and leaf were also down regulated within development. Moreover, *Cppgip6* gene expression was a hundred thousand times more abundant than *Cppgip4*. The recombinant protein expression in *Pichia pastoris* did not result positive, probably because of the ideal conditions of induction have not been properly established the yet. The activity of PGIPs extracted directly from the tissue was measured by the agar diffusion assay using pectinase from *Aspergillus niger* and showed decrease of inhibition during fruit developed in accordance with the results of the qPCR analysis. Based on the results it is possible to suggest the expression of these genes varies temporally with the developmental stage of the fruit and is tissue-specific, possibly in response to the different susceptibility of tissues to pathogenic attack. In addition, the lowest levels of PGIP expression were achieved at the fruit ripening, when the susceptibility to fungal infection is high and could signal for regulating the degradation process characterized by the onset of senescence.

Keywords: PGIP, cloning, gene expression, phytopathogens, agar diffusion assay

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Plantas e frutos do mamoeiro analisados em duas amostragens biológicas distintas. Foram coletadas amostras de plantas em duas idades diferentes (3 e 6 meses após a semeadura). Frutos imaturos (30, 60, 90 e 110 DPA) e maduros (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 DPC).....31
- Figura 2.** Mapa do vetor de expressão pPICZalfaB (3593 pb - Invitrogen).....45
- Figura 3.** Parâmetros físico-químicos de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) das amostragens durante o amadurecimento. (A) Etileno produzido pelos frutos, medido por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (etileno $\mu\text{L Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$); (B) CO_2 produzido pelos frutos, medido por cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica ($\text{CO}_2 \text{ mL Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$); (C) Firmeza da polpa, medida com penetrômetro, e expressa como força necessária para a penetração da ponteira do equipamento no tecido vegetal (N). As barras verticais representam o erro padrão ($n= 4$).....53
- Figura 4.** Alinhamento entre as sequências nucleotídicas dos dois fragmentos de prováveis genes de PGIPs de mamoeiro (*Cppgip4* e *Cppgip6*). Os números à direita indicam o total de nucleotídeos apresentados em cada linha. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos nas duas sequências. A seta indica o sítio de clivagem do peptídeo sinal. Os nucleotídeos sublinhados indicam as sequências dos iniciadores senso e antisenso utilizados para amplificação e clonagem.....57
- Figura 5.** Alinhamento múltiplo entre as sequências deduzidas de aminoácidos de algumas das sequências de PGIPs utilizadas para prospecção do genoma do mamoeiro e as sequências de *Cppgip4* e *Cppgip6*, seguidas de seus respectivos códigos no GenBank, com o software CLUSTALW. Os asteriscos indicam resíduos idênticos em todas as sequências, dois pontos indicam substituições conservadas e um ponto indica substituições semiconservadas. Os números à direita indicam o total de resíduos de aminoácidos apresentados em cada linha. As linhas horizontais indicam as posições das LRRs. As setas verticais cinza exemplificam algumas diferenças entre aminoácidos de *Cppgip4* e *Cppgip6* que afetam a especificidade da proteína.....59
- Figura 6.** Representação esquemática do modelo tridimensional de *Cppgip4* (A) e *Cppgip6* (B) preditos a partir da estrutura de PGIP de *Phaseolus vulgaris* (PvPGIP2) presente no banco de dados utilizando o servidor SWISS-MODEL.....61
- Figura 7.** Representação gráfica da detecção do peptídeo sinal de CpPGIP4 (A) e CpPGIP6 (B) preditos pelo software SignalP a partir da sequência de aminoácidos que codificam os referidos polipeptídeos.....62
- Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA total extraídos das polpas de mamões amostrados durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA) (A); durante os 9 dias pós-colheita (DPC) (B); e das raízes (1 e 2), caule (3 e 4), folhas (5 e 6) de plantas de mamoeiro amostradas ao 3 meses (1, 3 e 5) e aos 6 meses de idade (2, 4 e 6) e também de sementes de frutos amostrados durante o desenvolvimento aos 90 DPA (7), e na fase de pós-colheita aos 2 DPC (8) (C), revelados com coloração com 'SYBR Safe DNA Gel Stain' da Invitrogen na diluição 1:10.000 (v/v) e visualizados sob luz ultravioleta. Ao lado direito estão indicadas as posições das bandas dos RNA ribossomais.....64
- Figura 9.** Eletroforeses em gel de agarose dos produtos da PCR aos 60 e 90 DPA e do 1 DPC ao 9 DPC para *Cppgip4* – (A) e *Cppgip6* – (B). Os fragmentos obtidos foram visualizados por coloração com 'SYBR Safe'. Os números da esquerda referem-se aos

tamanhos (pb) dos amplicons obtidos. Nas colunas à esquerda dos géis, indicadas por M, foram aplicadas alíquotas do padrão do tamanho de DNA.....65

Figura 10. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do consenso do produto da amplificação de *Cppgip4* a partir dos cDNAs dos frutos aos 90 DPA, 3 DPC e 8 DPC com os iniciadores *Cppgip4* senso e *Cppgip4* antisense. A sequência deduzida de aminoácidos está apresentada na linha inferior, a partir do quadro de leitura (frame) +1. As letras representam o código IUB/IUPAC para aminoácidos. Os números à direita de cada linha indicam os nucleotídeos contados na respectiva linha. O asterisco representa o códon de terminação. Os nucleotídeos delimitados pelos retângulos indicam os iniciadores utilizados para amplificação dos genes.....66

Figura 11. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do consenso do produto da amplificação de *Cppgip6* a partir dos cDNAs dos frutos aos 90 DPA, 3 DPC e 8 DPC com os iniciadores *Cppgip6* senso e *Cppgip6* antisense. A sequência deduzida de aminoácidos está apresentada na linha inferior, a partir do quadro de leitura (frame) +1. As letras representam o código IUB/IUPAC para aminoácidos. Os números à direita de cada linha indicam os nucleotídeos contados na respectiva linha. Os nucleotídeos delimitados pelos retângulos indicam os iniciadores utilizados para amplificação dos genes.....67

Figura 12. Análise de regressão da relação entre o ciclo limiar (Ct) e o log da quantidade de RNA (ng) referente às curvas padrão de eficiência da reação para os genes de referência (β -actina, fator de alongação-TEF e ubiquitina-UBQ) e para *Cppgip4* e *Cppgip6* a partir de diluições seriadas dos cDNAs da polpa e da casca. β -actina (ACT), ubiquitina (UBQ), fator de alongação (TEF), *Cppgip4* (Ct4) e *Cppgip6* (Ct6). Cada valor de Ct corresponde à média de uma quadruplicata técnica.....69

Figura 13. Valores médios de estabilidade da expressão dos genes de referência β -actina (ACT), Ubiquitina (UBQ) e Fator de alongação (TEF). Valores menores indicam uma maior estabilidade para as amostragens 1 e 2 da casca e da polpa (1-C; 1-P; 2-C; 2-P), analisados pelo programa RefFinder. A estabilidade dos genes foi medida pelo (A) método do Δ Ct, (B) BestKeeper, (C) Normfinder e (D) geNorm.....72

Figura 14. Expressão relativa de *Cppgip4* e *Cppgip6* da polpa e da casca de mamões colhidos durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA), e durante os 9 dias pós-colheita (DPC), em duas amostragens distintas. A amostragem 1 foi realizada em jan/2010 (■) e amostragem 2 em jan/2011 (□). Os dados foram normalizados em relação ao gene da ubiquitina (UBQ), adotado como referência, e expressos considerando o 1 DPC como 1 unidade de expressão gênica. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos do desenvolvimento dentro de uma mesma amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis.....75

Figura 15. Expressão relativa de *Cppgip4* e *Cppgip6* da polpa e da casca de mamões colhidos durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA), e durante os 9 dias pós-colheita (DPC), em duas amostragens distintas. A amostragem 1 foi realizada em jan/2010 (■) e amostragem 2 em jan/2011 (□). Os dados foram normalizados em relação ao gene do fator de alongação (TEF), adotado como referência, e expressos considerando o 1 DPC como 1 unidade de expressão gênica. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos do desenvolvimento dentro de uma mesma amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis.....76

Figura 16. Expressão absoluta de *Cppgip4* e *Cppgip6* da polpa e da casca de mamões colhidos durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA), e durante

os 9 dias pós-colheita (DPC), em duas amostragens distintas. A amostragem 1 foi realizada em jan/2010 (■) e amostragem 2 em jan/2011 (■). Os valores foram determinados a partir da curva de calibração com DNA plasmidial. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos do desenvolvimento dentro de uma mesma amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis.....79

Figura 17. Análise de regressão da relação entre o “Cycle threshold” ou ciclo limiar (Ct) e o log da quantidade de RNA (ng) referente às curvas padrão de eficiência da reação para os genes de referência (ACT; UBQ; TEF) e para os genes de *Cppgip4* (Ct4) e *Cppgip6* (Ct6) construídas a partir de diluições seriadas do pool de cDNA de raízes, caules, folhas e semente. Cada valor experimental de Ct corresponde à média de uma quadruplicata técnica.....82

Figura 18. Número de cópias de *Cppgip4* e *Cppgip6* nas amostragens 1 (■) e 2 (■) por mg de tecido (A) e por µg de RNA total (B) das raízes de plantas com 27 cm (R1) e 105 cm (R2); caule das plantas com 27 cm (C1) e 105 cm (C2); folhas de plantas com 27 cm (F1); das folhas das plantas com 105 cm (F2); de sementes (S1), casca (Cc1) e polpa (P1) de frutos aos 90 dias pós-antese (DPA) e das sementes (S2), casca (Cc2) e polpa (P2) de frutos no 2 DPC. Os valores foram determinados a partir da curva de calibração com DNA plasmidial contendo o inserto do gene de *Cppgip4* e de *Cppgip6* clonado a partir do vetor pTZ57R/T. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 5). Letras diferentes entre os diferentes tecidos indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças entre as amostragens são apresentadas no apêndice (Tabela 8).....84

Figura 19. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos do “PCR colony” de alguns dos clones de pPICZαB + *Cppgip4* (1 a 3) e de pPICZαB + *Cppgip6* (4 a 6) utilizando os iniciadores 5'AOX e 3'AOX. Os fragmentos obtidos foram visualizados por coloração com ‘SYBR Safe’. Os números da esquerda referem-se aos tamanhos (pb) das bandas do padrão de peso molecular de DNA (M) próximas ao tamanho do amplicon obtido.....88

Figura 20. Análise fenotípica de *P. pastoris* transformadas com a construção pPICZαB + *Cppgip4*. As colônias foram crescidas em meio MDH (A) e em meio MMH (B) durante 48 horas para a determinação dos fenótipos Mut ou Mut⁺. Cada placa foi dividida em oito setores e em cada um deles foi estriada parte de uma colônia positivamente transformada.....89

Figura 21. Separação eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5% dos extratos de *P. pastoris* transformada com a construção pPICZαB + CpPGIP4. **M:** Marcador: Unstained Protein Molecular weight marker (Fermentas Life Science). **1:** proteínas do sobrenadante do vetor desprovido de inserto. **2:** proteínas do precipitado do vetor desprovido de inserto. **3:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **4:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **5:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **6:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **7:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). **8:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). A seta a direita indica a possível localização da proteína de interesse (~37KDa).....90

Figura 22. Western Blotting dos extratos de *P. pastoris* transformada com a construção pPICZαB + CpPGIP4. Foi utilizado o anticorpo anti-coelho para PvPGIP (anticorpo para PGIP de feijão) **M:** Marcador: Prestained Protein Molecular weight marker (Fermentas Life Science). **1:** proteínas do sobrenadante do vetor desprovido de inserto. **2:** proteínas do precipitado do vetor desprovido de inserto. **3:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB +

CpPGIP4 (construção 1). **4:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **5:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **6:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **7:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). **8:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3).....91

Figura 23. Western Blotting dos extratos de *P. pastoris* transformada com a construção pPICZαB + CpPGIP4. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-histidina (HIS-TAG) **M:** Marcador: Prestained Protein Molecular weight marker (Fermentas Life Science). **1:** proteínas do sobrenadante do vetor desprovido de inserto. **2:** proteínas do precipitado do vetor desprovido de inserto. **3:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **4:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **5:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **6:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **7:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). **8:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3).....92

Figura 24. Avaliação da inibição da atividade de pectinase comercial de *Aspergillus niger* por PGIP determinada pelo ensaio de difusão radial em gel de agarose contendo ácido poligalacturônico. As regiões claras nas placas relativas à descoloração no gel indicam a zona de ocorrência da atividade da pectinase. **A:** Ensaio da atividade inibitória de PGIP em extrato de proteína da casca amostragem 1 e da **(B)** casca da amostragem 2. **C:** Ensaio da atividade inibitória de PGIP em extrato de proteína da polpa amostragem 1 e da **(D)** polpa da amostragem 2. Números de 1 a 5: apenas o extrato proteico, de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente; 6 a 10: controle contendo pectinase *in natura*+ extrato proteico fervido de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente; 11 a 15: pectinase *in natura* + extrato proteico de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente; 16 a 20: controle contendo pectinase fervida + tampão de ressuspensão.....95

Figura 25. Avaliação da inibição da atividade de pectinase comercial de *Aspergillus niger* por PGIP determinada pelo ensaio de difusão radial em gel de agarose e medida a partir da medida do diâmetro (■) do halo formado na zona de ocorrência da reação e também da intensidade de cor por área (■). Os resultados são expressos em porcentagem de inibição (%) obtida a partir da diferença da medida do halo formado ao redor dos poços que continham apenas o extrato proteico e o controle contendo pectinase fervida + tampão de ressuspensão e da medida do halo formado ao redor dos poços contendo pectinase *in natura* + extrato proteico fervido de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente e pectinase *in natura* + extrato proteico de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente. Cada valor corresponde à média de uma triplicata técnica. As barras verticais indicam o erro padrão.96

Figura 26. Inibição da atividade de pectinase comercial de *Aspergillus niger* determinada pela difusão radial em gel de agarose contendo ácido poligalacturônico. As regiões claras nas placas indicam a zona de ocorrência da atividade da pectinase. **A:** Casca- amostragem 1; **B:** Casca – amostragem 2; **C:** Polpa- amostragem 1; **D:** Polpa – amostragem 2. Números 1 a 5: apenas o extrato proteico, de 30 DPA a 9°DPC, respectivamente; 6 a 10: pectinase fervida + extrato proteico de 30 DPA a 9°DPC, respectivamente; 11 a 15: pectinase *in natura* + extrato proteico de 30 DPA a 9°DPC, respectivamente; 16 a 20: pectinase fervida + tampão de ressuspensão.....116

Figura 27. Porcentagem de inibição da atividade de pectinase comercial de *Aspergillus niger* determinada pela difusão radial em gel de agarose contendo ácido poligalacturônico e calculada a partir do diâmetro dos halos e da intensidade de cor dos mesmos dentro das áreas delimitadas para cada um deles na casca da amostragem 1 **(A)**, na casca da amostragem 2 **(B)**, na polpa da amostragem 1 **(C)** e na polpa da amostragem 2 **(D)** de frutos

aos 30 DPA, 110 DPA, 1DPC, 5DPC e 9DPC. As barras verticais indicam o desvio
padrão.....117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores.....	36
Tabela 2. Sequência dos iniciadores para qPCR.....	40
Tabela 3. Controles e misturas de reação aplicados nos poços para análises da atividade inibitória de PGIP.....	50
Tabela 4. Lista dos <i>contigs</i> do mamão papaia portadores de sequências candidatas a codificarem PGIPs. As duas últimas sequências apresentadas (LG4_15848 e LG6_5084) foram as escolhidas para as análises.....	55
Tabela 5. Predição da sublocalização celular de CpPGIP4 e CpPGIP6 de acordo com o predito pelo servidor WOLFPSORT.....	62
Tabela 6. Análise estatística pelo teste de Tukey para a expressão relativa da polpa e da casca de CpPGIP comparando-as em termos de amostragem biológica.....	114
Tabela 7. Análise estatística pelo teste de Tukey para a expressão absoluta da polpa e da casca de CpPGIP comparando-as em termos de amostragem biológica.....	114
Tabela 8. Análise estatística pelo teste de Tukey para a expressão absoluta de CpPGIP dos outros tecidos comparando-os em termos de amostragem biológica.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μF	microFaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
Abs(A_{xxx})	absorbância
AOX	gene que codifica para a álcool oxidase
Asp	ácido aspártico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMGY	Buffered Minimal Glycerol Medium
BMMY	Buffered Methanol Complex Medium
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
Ct	Cycle threshold (ciclo limiar)
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeos
DPA	dias pós-antese
DPC	dias pós-colheita
E	eficiência
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
g ($\times g$)	força centrífuga (medida da gravidade)
g	grama
h	hora
HIS	histidina
IPTG	isopropylthio- β -galactoside
kb	quilobase
KDa	quilodalton
Kg	quilograma
L	litro
LB	Luria-Bertani
LG	linkage group
LRR	leucine rich repeat
M	molar
m/v	razão massa/volume
MDH	Minimal Dextrose Medium
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MMH	Minimal Methanol Medium
N	Newton
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	graus centígrados
OD	densidade ótica
Oligo(dT)	sequência curta de deoxy-thymine nucleotides
ORF	open reading frame (quadro de leitura aberto)
PAMP	padrão molecular associado ao patógeno
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato salino
PBST	tampão fosfato salino com Tween

PCR	reação em cadeia da polimerase
PG	enzima poligalacturonase
PGIP	proteína inibidora de poligalacturonase
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
qPCR	PCR quantitativa
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAE	tri-acetato-EDTA
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
Tm	melting temperature (temperatura de dissociação)
UDG	Uracil- DNA Glycosylase
V	volts
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
YNB	yeast nitrogen base (base nitrogenada de levedura)
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
ZEO	antibiótico zeocina
Δ Ct	delta Ct
Ω	Ohms

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 MATERIAL VEGETAL	30
3.2 MEDIDAS DA RESPIRAÇÃO, PRODUÇÃO DE ETILENO E FIRMEZA DA POLPA	32
3.3 PROSPECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS DE PGIPs	32
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	33
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	34
3.6 PURIFICAÇÃO	34
3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS	35
3.8 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) FITA SIMPLES	35
3.9 INICIADORES	36
3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	36
3.11 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA PCR	36
3.12 CLONAGEM	37
3.13 MINI-PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS E DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	38
3.14 SEQUENCIAMENTO	38
3.15 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA (qPCR)	39
3.16 PRODUÇÃO DE PGIP RECOMBINANTE EM <i>Pichia pastoris</i>	43
3.16.1 Amplificação das seqüências de PGIP	43
3.16.2 Clonagem e expressão em <i>Pichia pastoris</i>	44
3.16.3 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> GS115 por eletroporação	46
3.16.4 Determinação do fenótipo Mut ^s ou Mut ⁺ das colônias	47
3.16.5 Crescimento de células transformadas e indução da expressão	47
3.16.6 Concentração das amostras	48
3.17 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	48
3.18 WESTERN BLOTTING	48
3.19 ATIVIDADE DE PGIP POR DIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE	49
3.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

4.1 ANÁLISES DA RESPIRAÇÃO, PRODUÇÃO DE ETILENO E FIRMEZA DA POLPA	52
4.2 SELEÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CANDIDATAS	54
4.3 CLONAGEM DOS cDNAs DE PGIPs DE MAMÃO	63
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA (qPCR)	68
4.4.1 Análise da expressão gênica na casca e na polpa	68
4.4.2 Análise da expressão gênica em outros tecidos	81
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CpPGIP EM <i>P. pastoris</i>	87
4.6 ATIVIDADE DE PGIP POR DIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE	93
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
6 REFERÊNCIAS.....	102
7 APÊNDICE.....	114

1 INTRODUÇÃO

Durante o amadurecimento ocorrem várias alterações físico-químicas que contribuem para a palatabilidade do fruto maduro. Apesar dessas alterações serem desejáveis por tornarem o fruto comestível, elas também diminuem o tempo de conservação na fase pós-colheita, pois o fruto maduro é mais propenso à deterioração causada por organismos fitopatogênicos, como fungos, bactérias e insetos. As alterações nos níveis de alguns componentes do vegetal, como taninos, compostos fenólicos e fitoalexinas, que naturalmente agem como uma barreira à infecção, e o aumento da disponibilidade de componentes nutritivos, como açúcares, ácidos e vitaminas ao longo do desenvolvimento dos frutos, resultam em um meio propício para a invasão e o crescimento dos fitopatógenos (JOBLING, 2000). Além disso, a diminuição da resistência do tecido, e consequente diminuição da firmeza na polpa dos frutos, aumenta a sensibilidade da epiderme às injúrias mecânicas (BRUMMELL e HARPSTER, 2001) e podem servir como porta de entrada de patógenos.

No mamoeiro, assim como em grande parte dos frutos, as perdas pós-colheita causadas por microrganismos são as mais expressivas, e aquelas causadas por fungos são as que geram maior impacto econômico por serem as mais comuns e por tornarem os frutos inviáveis para a comercialização e o consumo (DICKMAN, 1994).

Durante a fase de invasão fúngica, a primeira barreira natural que impede a infecção é a parede celular, rica em pectina, com uma estrutura organizada e arranjada de modo que, apesar de permitir o crescimento das células vegetais, mantém a conformação do tecido. Frente a essa barreira física, a infecção progride à medida que os fungos fitopatogênicos liberam enzimas que são capazes de degradar essa estrutura e que propiciam condições para a invasão, o crescimento e a propagação fúngica (HUANG et al., 2000).

Uma vez que a liberação de enzimas degradativas da parede celular é parte preponderante do processo de infecção, inibidores de enzimas fúngicas presentes no tecido vegetal tem sido considerados importantes por integrarem o conjunto de mecanismos de defesa vegetal que limitam o desenvolvimento de doenças causadas por esses fitopatógenos (CERVONE et al. 1989; STOTZ et al. 1993, 1994).

O processo que envolve a degradação da parede celular vegetal pela ação fúngica é complexo e exige uma ação conjunta de enzimas de degradação da

parede celular e também de proteínas que facilitem a penetração nos tecidos vegetais. Um grupo variado de enzimas extracelulares digestoras é liberado durante o processo de infecção fragmentando polímeros como a lignina, a celulose e algumas proteínas que originarão compostos importantes no crescimento e no progresso da infecção (SHAH et al., 2012). Dentre as pectinases fúngicas que primeiro atuam quando em contato com o tecido vegetal estão as esterases, como a pectinametilesterase (EC 3.1.1.11), e as hidrolases, como o grupo das endo e exopoligalacturonases. A ação dessas enzimas, principalmente das poligalacturonases (PGs) fúngicas, tanto com atividade endo quanto exo, iniciadoras do processo degradativo e primeiras enzimas liberadas a partir do contato do patógeno com o vegetal, é induzida pela presença do ácido galacturônico e de seus polímeros constituintes das paredes celulares (KESTER e VISSER, 1990), o que indica que os produtos de degradação de polímeros da parede celular também podem estimular a liberação das enzimas fúngicas. Além disso, elas dependem também da natureza da ligação do substrato, presente no tecido vegetal, ao sítio ativo de suas proteínas e ainda mais do grau de afinidade entre eles, dependendo do tamanho e da posição dos grupos catalíticos presentes na cadeia (REXOVA-BENKOVA, 1973; NITURE, 2008).

Do contato dos fungos com a parede celular do vegetal resultam processos de reconhecimento e de interação entre o patógeno e o hospedeiro que podem ser não-específicos, quando ocorre liberação de fragmentos da parede celular, decorrentes da fase inicial de infecção e degradação ou mesmo do contato direto com as células fúngicas, e geram produtos potencialmente indutores das respostas à infecção. Além de controlar o avanço da doença, também geram elicitores de defesa, que são moléculas originárias de plantas infectadas ou fitopatógenos que são capazes de sinalizar para a indução bioquímica e/ou estrutural e que levam à indução de resistência no tecido (DIXON et al., 1994). Por outro lado, há processos de reconhecimento mais específicos nos quais a interação é direta (gene a gene) e para cada gene que confere resistência no hospedeiro há um gene que confere virulência ao agente patogênico (BLUMWALD, AHARON E LAM, 1998). Dos variados tipos de interação entre patógeno e hospedeiro surge a hipótese de que os fenômenos de inibição e ativação são consequência das modificações estruturais das poligalacturonases quando ligadas ao sítio alostérico do inibidor e explicam a diversificação adaptativa que proporciona a interação com múltiplas PGs (MISAS-

VILLAMIL e VAN DER HOORN, 2008; GUTIERREZ-SANCHEZ et al., 2012). Essa interação, que é mais comum quando ocorre o contato direto do fungo com o tecido hospedeiro, requer níveis de modificação estrutural que chegam a padrões de alteração em nível de aminoácidos.

Um sistema especial de defesa vegetal contra a atividade degradativa, presente de maneira abrangente nas monocotiledôneas e dicotiledôneas, é constituído pelas proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) (CERVONE et al., 1987). As PGIPs têm como função retardar a atividade de PGs, podendo prevenir contra a degradação da parede celular e, conseqüentemente, contra o crescimento do fungo e colonização dos tecidos. Essas proteínas constituem um sistema de defesa versátil capaz de reconhecer diferentes motivos proteicos funcionalmente semelhantes em termos de ligação à parede celular e que possam apresentar estruturas diferenciadas (SPADONI et al., 2006). Estruturalmente, as PGIPs atuam simultaneamente inibindo ligações de PGs fúngicas aos substratos quando se ligam de forma reversível a essas enzimas em uma faixa de pH variando entre 4,5 e 6, e conseqüentemente bloqueando seus sítios ativos, bem como prevenindo a degradação total de oligouronídeos (CERVONE et al., 1987; DE LORENZO e FERRARI, 2002). A ligação da PGIP à PG fúngica forma um complexo que pode levar a redução das taxas de hidrólise em cerca de duas ordens de magnitude quando comparadas àquelas observadas para os casos em que as PGs não estão ligadas a PGIP (COOK et al. 1999; KEMP et al., 2004).

As PGIPs são membros da família de proteínas extracelulares com repetições *in tandem* de sequências ricas em leucina (LRR – Leucine Rich Repeat) do tipo extracitoplasmáticas (JONES e JONES, 1997), encontradas em muitas proteínas que fazem interações proteína-proteína e ligante-receptor e que podem estar relacionadas com funções de resistência de plantas a patógenos por pertencerem ao grupo das proteínas PR (relacionadas à patogênese) (LIU et al., 2013) e também de transdução de sinal (KOSAK e JONES, 2000; DI MATTEO et al., 2003; CHENG et al., 2008). A sequência de LRR é um motivo estrutural no qual as sequências-consenso das unidades repetidas são bastante similares, considerando a variedade de organismos e a amplitude de funções das diferentes proteínas, o que sugere uma forte pressão seletiva para a conservação dessa estrutura (JONES e JONES, 1997).

As PGIPs são glicoproteínas com massa molecular de aproximadamente 40KDa e elevado valor de ponto isoelétrico (DE LORENZO et al., 2001), que

apresentam entre 300 e 330 aminoácidos e são compostas tipicamente de 10 motivos imperfeitos de LRR com aproximadamente 24 aminoácidos cada. Esses motivos são compostos por resíduos estruturais hidrofóbicos (leucinas) que são combinados com resíduos não-conservados contidos no lado côncavo interior da molécula e conferem especificidade à ligação das PGIPs com as poligalacturonases fúngicas (DI MATTEO et al., 2003; D'OVIDIO et al., 2004). Geralmente, não apresentam interrupção por íntrons, ou quando eles ocorrem, como em *Arabidopsis thaliana* e framboesa, estão inseridos na mesma posição (DE LORENZO et al., 2001). A interação das PGIPs com as PGs exógenas limita o potencial destrutivo dessas enzimas sobre a parede e gera um acúmulo de oligogalacturonídeos que atuam como elicitores ativadores de uma cascata de respostas de defesa (DE LORENZO et al., 2001; DI MATTEO et al., 2006). Esses oligossacarídeos podem ativar respostas como a síntese de fitoalexinas, lignina e etileno, expressão de inibidores de proteinases e produção de espécies reativas de oxigênio (RIDLEY et al., 2001; FEDERICI et al., 2006), que são ativadas pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) bem como o acúmulo de enzimas e compostos fenólicos relacionados à defesa como a catalase, a peroxidase e a fenilalanina amônia-liase, sabidamente importantes para os mecanismos de defesa contra patógenos (SHI et al., 2011). Nesse contexto, o papel das PGIPs seria de não apenas dificultar a ação das PGs exógenas sobre a parede celular vegetal, mas também aumentar o tempo de ação desses oligômeros, prolongando a ativação das respostas de defesa (GOMATHI e GNANAMANICKAM, 2004).

No vegetal, as proteínas de defesa contra o ataque fitopatogênico dependem da posição de alguns aminoácidos na cadeia polipeptídica que podem ser determinantes na ligação, na especificidade da reação e no modo de ação de algumas enzimas fúngicas, como por exemplo a presença do resíduo de ácido aspártico (Asp) que atua de maneira efetiva, dentro do sítio ativo da proteína, interagindo com uma molécula de água que será necessária durante a clivagem. Outros resíduos de ácido aspártico também participam da reação de clivagem, na região do sítio ativo, e podem conferir uma menor capacidade de reação da PGIP caso haja uma mutação na sua posição (FEDERICI et al., 2001; DI MATTEO et al., 2003).

Muitas espécies de plantas têm PGIPs localizadas no apoplasto e algumas delas, incluindo as de frutos comercialmente importantes, foram purificadas e

caracterizadas diretamente da parede celular. Em cerca de 25 espécies vegetais muitos dos genes codificadores para PGIPs também já foram clonados (TOUBART et al., 1992; STOTZ et al., 1993, 1994; FAVARON et al., 1994; JOHNSTON et al., 1994; SIMPSON et al., 1995; YAO et al., 1995; CHIMWAMUROMBE et al., 2001). Em várias espécies de plantas, as PGIPs apresentam características bioquímicas quase idênticas e são codificadas por uma família multigênica, apresentando-se organizadas em *cluster* em uma região específica do cromossomo e sendo seus genes diferencialmente regulados e expressos, espacial e temporalmente, a partir de vias diferentes de transdução de sinal durante o desenvolvimento do organismo e em resposta às várias situações de estresse.

A análise funcional de promotores tem revelado que alguns genes que codificam PGIPs respondem somente à injúria, enquanto outros são induzidos por injúria e ácido salicílico ou oligossacarídeos (DE LORENZO et al., 2001). Essa indução da expressão de PGIPs ocorre nos estádios iniciais da infecção, retardando a atuação das PGs liberadas pelo patógeno, mas sem interferir na atividade fisiologicamente programada das PGs de origem endógena, uma vez que as PGs derivadas das plantas não apresentam capacidade de interagir com PGIPs (DE LORENZO, 2001) da mesma espécie vegetal possivelmente devido ao grau de especificidade de reconhecimento, limitador dessa interação e que também pode explicar o fato de plantas que são transformadas, com PGIPs originadas de outras plantas não reagirem contra as PGs endógenas liberadas pelas mesmas. Além do estresse gerado pela presença de organismos fitopatogênicos sobre o tecido vegetal, outros estresses também podem ser fortes indutores de PGIPs, como já foi demonstrado por outros autores, que reportaram que outras situações tais como danos mecânicos, tratamento com ácido salicílico, que atua como indutor do estresse sistêmico na planta, metil jasmonato, auxina e exposição ao frio poderiam induzir o aumento da síntese de PGIPs em maçã (YAO et al., 1999), soja (D'OVIDIO et al., 2006), morango (SCHAART et al., 2005), pêssego (LIANG et al. 2005), *Arabidopsis* (FERRARI et al., 2003) e em uva (JOUBERT et al., 2013).

Como observado por alguns autores (ABU-GOUKH; STRAND e LABAVITCH, 1983; YAO; CONWEY e SAMS, 1995), o conteúdo de PGIPs correlaciona-se com os processos morfogênicos e de desenvolvimento da planta, tais como o progresso de formação do tubo polínico e o amadurecimento dos frutos, e o nível de PGIPs

parece ser diretamente proporcional à proteção contra o ataque de patógenos (DE LORENZO et al., 2001; DI et al. 2006).

Muitos estudos têm mostrado que algumas PGIPs são expressas predominantemente em tecidos de frutos, como tomate, maçã e framboesa, e em outros casos, como o feijoeiro, elas podem ser expressas em tecidos vegetativos, sugerindo a pré-existência de PGIPs em tecidos jovens para conferir uma proteção basal do tecido ou órgão (JOHNSTON et al., 1993; STOTZ et al., 1993, 1994; YAO; CONWEY e SAMS, 1995). Cada espécie parece ter múltiplas PGIPs com especificidades diferentes contra PGs fúngicas e serem produtos de múltiplos genes, como foi demonstrado para o feijão, apresentando 4 glicoformas, diferindo apenas na composição glicídica da proteína (FREDIANI et al., 1993) e para o tomate, em que foram identificadas 7 glicoformas (STOTZ et al., 1994). Os genes dessas glicoformas podem apresentar, para alguns vegetais, níveis contínuos de expressão e de transcritos ao longo do desenvolvimento promovendo acréscimo ou depleção na atividade das proteínas. Essa regulação pode ser um controle pós-traducional ou uma resposta a algum fator presente durante o amadurecimento. Essa resposta é encontrada, por exemplo, em frutos de framboesa, nos quais os níveis de transcrição de PGIPs foram mantidos constantes ao longo do amadurecimento enquanto o padrão de atividade proteica foi reduzido ao longo do amadurecimento (RAMANATHAN et al., 1997).

Para outros tecidos das plantas, as PGIPs podem acumular-se em taxas variadas de acordo com o grau de requerimento das mesmas no tecido como um todo ou mesmo como resposta a um processo infeccioso local, no qual ocorre acúmulo dessas proteínas apenas em regiões ao redor dos pontos de penetração do fungo (DEVOTO et al., 1997). Em muitos casos, a expressão dos genes em níveis basais em todos os tecidos da planta pode conferir proteção ao vegetal potencialmente exposto ao ataque fúngico (DEVOTO et al., 1997).

De acordo com estudos realizados com peras (ABU-GOUKH; STRAND e LABAVITCH, 1983), maçãs (YAO, 1999) e framboesas (JOHNSTON, 1993), os níveis de atividade de PGIPs são mais elevados em frutos imaturos de que em frutos maduros. Em peras, um declínio na concentração de PGIP levou a um aumento da suscetibilidade aos fungos *Dithiorella gregaria* e *Botrytis cinerea* e, em framboesa, o nível de PGIP foi máximo em frutos verdes imaturos, os quais foram mais resistentes ao ataque de fungos que os frutos maduros (SALVI et al., 1990; POWELL et al.,

2000). Essa aparente contradição entre a diminuição dos níveis de PGIPs justamente numa etapa do desenvolvimento em que os tecidos encontram-se mais suscetíveis à infecção por fungos, ou seja, quando os frutos estão com a polpa mais macia e rica em nutrientes, revela o que pode ser uma alteração programada dos níveis de PGIPs, de modo a facilitar a decomposição dos tecidos e permitir que os frutos cumpram seu papel biológico relativo à liberação e dispersão das sementes.

No entanto, do ponto de vista tecnológico e de manejo pós-colheita, seria interessante que essa proteção conferida pelas PGIPs pudesse ser prolongada a fim de diminuir a suscetibilidade às podridões. Assim, estudos da interação entre PGIPs e PGs fúngicas, e da influência das PGIPs sobre as PGs da própria planta, e também de manipulação dos níveis de PGIPs nos tecidos, podem fornecer informações relevantes para uma abordagem biotecnológica mais aperfeiçoada da resistência a doenças (JOUBERT et al., 2006, ESQUERRÈ TUGAYÈ et al., 2000; FEDERICI et al., 2001; DE LORENZO E FERRARI, 2002).

Em frutos como maçãs e caquis, há resultados suficientes para sustentar a ideia de que a manipulação de PGIPs pode ser útil para a redução da podridão dos frutos causada pela infecção fúngica específica (TAMURA et al., 2004; GREGORI et al., 2008). Em plantas em que a manipulação de PGIPs preveniu contra infecções fúngicas observou-se redução nos sintomas de infecção pela transferência desses genes de PGIP para outra espécie. Como demonstrações de que a manipulação de PGIPs pode ocasionar uma diminuição da suscetibilidade às podridões, por meio da inibição das PGs fúngicas, podem ser destacados os experimentos de transferência de genes de PGIPs de pera para tomate (POWELL et al., 2000), de pera para caqui (TAMURA et al., 2004), de feijão para tabaco (DE LORENZO e FERRARI, 2002) e também de superexpressão de genes de PGIP em *Arabidopsis* (FERRARI et al., 2003; JOUBERT et al., 2006). Em relação aos efeitos sobre as PGs endógenas, que poderiam comprometer o processo normal de amaciamento da polpa relacionado com o amadurecimento, foi notado que plantas transgênicas super-expressando PGIPs exibiram amaciamento normal dos frutos, demonstrando, dessa forma, que as PG endógenas não são inibidas pelas PGIPs (STOTZ et al., 1994).

A alta perecibilidade de alguns frutos é o principal problema enfrentado pelos produtores na comercialização *in natura*, tanto no mercado nacional quanto internacional. Esse é o caso do mamoeiro, *Carica papaya* L., que é uma planta herbácea de grande importância econômica por ser de produção ao longo de todo o

ano, com frutos aproveitados tanto para consumo *in natura* quanto para serem utilizados pela indústria (ALVES et al., 2000). Os frutos do mamoeiro são de natureza frágil e as perdas pós-colheita podem ocorrer principalmente pelo manuseio e pelo controle inadequado do amadurecimento em si (BLEINROTH, 1995; GAYET et al., 1995), o que explica a busca por estratégias mais eficientes de conservação, como o uso do inibidor de amadurecimento 1-metilciclopropeno (FABI et al., 2007; BRON et al., 2006; JACOMINO et al., 2007).

Dentre as doenças que causam maior prejuízo na cultura do mamão, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., é a que mais se destaca. Esse fungo é considerado o maior patógeno vegetal em termos de perdas econômicas, em diversas frutíferas (FREEMAN et al., 1998) e é responsável por infectar os frutos ainda na pré-colheita, quando estão fisiologicamente imaturos. Após a colheita a doença se desenvolve a partir da evolução do crescimento do fungo que permanecia quiescente sob a casca, interferindo na qualidade comercial do fruto (AKAMINE, 1953). Não apenas a antracnose, mas também a podridão peduncular é um fator limitante à exportação desse fruto (LIBERATO e TATAGIBA, 2001; VENTURA et al., 2003). A podridão peduncular é uma doença causada por inúmeros fungos que têm como principais agentes o *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., *Alternaria alternata*, *Phoma caricae-papayae*, *Fusarium solani* e *Botryodiplodia theobromae*, sendo *C. gloeosporioides* aquele que parece ser o de maior incidência, seguido por *P. caricaepapaye* (BOLKAN et al., 1976; ALVAREZ e NISHIJIMA, 1987; LIBERATO e TATAGIBA, 2001; OLIVEIRA e FILHO, 2004).

A elevada incidência de doenças nos frutos de mamoeiro, durante os meses mais quentes e úmidos do ano (outubro a março), tem afetado a produção nas principais regiões do Brasil, como o litoral norte do Espírito Santo e extremo Sul da Bahia (MARIN et al., 1995), e na ausência de medidas de controle a incidência pode chegar a 91% de antracnose e 100% de podridão peduncular nos frutos (LIBERATO e COSTA, 1997; TATAGIBA et al., 2002). Isso mostra a importância que o aumento da proteção de frutos de mamoeiro durante os períodos de suscetibilidade, através da resistência induzida ou adquirida, com ativação de mecanismos de resistência, pode ter em programas de manejo pós-colheita visando à diminuição de perdas.

Nesse sentido, a manipulação dos níveis de PGIPs ou a transferência de genes efetivos contra os patógenos de maior relevância poderiam ser estratégias úteis para a redução das podridões de mamão causadas por infecções fúngicas, à

semelhança do que já foi testado para tomate, pera, caqui e framboesa, sem, no entanto, trazer qualquer prejuízo ao amaciamento natural da polpa dessa fruta. Esse é um aspecto de fundamental importância na adoção de estratégias de controle ou minimização das perdas pós-colheita do mamão, uma vez que a qualidade final e a palatabilidade dessa fruta devem ser preservadas. O fato de não haver interferência das PGIPs sobre a atividade das PGs endógenas é um elemento importante a favor do potencial biotecnológico dessas proteínas no controle das infecções fúngicas em mamão, uma vez que evidências químicas, bioquímicas e moleculares sugerem um papel de destaque das PGs no processo de amaciamento normal dessa fruta durante o amadurecimento (SHIGA et al., 2009, FABI et al., 2009a, FABI et al., 2009b).

Apesar do grande potencial tecnológico, são inexistentes os trabalhos voltados para o estudo de caracterização e de funcionalidade das PGIPs em mamoeiro. Por ser uma planta bastante suscetível à injúria e ataque de patógenos, não apenas os frutos, mas também a planta como um todo, seria interessante desenvolver estudos sobre as suas PGIPs, uma vez que a manipulação dos níveis dessas proteínas em outros vegetais, por meio de super-expressão ou de transferência de genes entre espécies, foi capaz de diminuir significativamente a suscetibilidade às podridões por inibição das PGs fúngicas. Logo, as PGIPs são proteínas com claro potencial biotecnológico e a aplicação desse tipo de abordagem poderia contribuir significativamente para a redução das perdas pós-colheita. No entanto, para que isso possa ser alcançado, é necessário iniciar estudos voltados para as PGIPs do mamão diante do que foi visto para PGIPs de outras espécies. É possível formular a hipótese de que as mudanças no padrão de expressão desses genes ao longo do desenvolvimento e amadurecimento do mamoeiro sejam determinantes quanto ao grau de susceptibilidade e resistência ao avanço da infecção fúngica, o que reforça a necessidade de estudos que ampliem o conhecimento básico acerca dos genes de PGIPs presentes em mamoeiro bem como o modo de ação das proteínas geradas e sua efetividade contra os principais agentes de patogenicidade. Da mesma forma, também seria importante saber se a suscetibilidade do mamão ao ataque de fungos estaria condicionada àqueles patógenos que não são inibidos pelas PGIPs do próprio fruto, pois nesse caso a

transferência de genes de PGIPs de espécies resistentes a esses fungos poderia ser uma alternativa de controle mais eficiente da deterioração fúngica.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi clonar os prováveis genes de PGIPs do mamoeiro e conhecer seu padrão de expressão em diferentes tecidos da planta e ao longo do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Amostras de frutos do mamoeiro 'Golden' (*Carica papaya* L.) imaturos, representativos da fase pré-climatérica, em quatro idades diferentes, definidas a partir da maturidade fisiológica do pomar selecionado, foram coletadas aproximadamente aos 30, 60, 90 e 110 dias após a antese (DPA). Todos os frutos foram coletados em um mesmo momento e a escolha dos frutos com idades diferentes foi baseada em critérios e avaliações realizadas na mesma lavoura em trabalhos de campo realizados anteriormente (SANTOS, 2007; SILVA et al., 2010), o que permitiu estimar a idade do fruto por suas dimensões. Assim, frutos com 30 DPA apresentavam comprimento médio de 80 mm; 60 DPA: 100 mm; 90 DPA: 120mm e 110 DPA: 135 mm.

O material vegetal utilizado foi obtido junto a uma lavoura comercial localizada no município de Aracruz/ES Latitude 19° 24"(S) e Longitude 40° 04" (W) em duas amostragens, nos meses de janeiro de 2010 e janeiro de 2011. Para que se obtivesse uma estimativa da variabilidade biológica do material vegetal, as duas amostragens foram realizadas em épocas semelhantes do ano para que se uniformizassem as características dos frutos que fossem dependentes de condições ambientais.

As amostras de frutos fisiologicamente maduros foram coletadas no ponto de colheita comercial, aproximadamente 140 dias após a antese, e totalizaram 70 frutos. Para esses frutos fisiologicamente maduros foram realizadas medidas de CO₂, etileno e firmeza da polpa durante nove dias após a colheita e foram congelados em ultrafreezer separadamente a polpa e a casca de cinco frutos por dia, compondo o *pool* de amostras diário.

Para os outros tecidos (caule, raiz e folha) estudados foram realizadas duas coletas em anos consecutivos (2012 e 2013), na mesma época do ano, entre os meses de janeiro e março. Plantas com três e seis meses de idade a partir da semeadura foram coletadas, sendo que as com três meses apresentavam altura variando de 27 a 32 cm, enquanto as plantas com seis meses apresentavam entre 105 e 112 cm de altura. Cinco plantas representativas de cada fase foram coletadas em cada amostragem e os órgãos utilizados nas análises foram congelados

separadamente. A estimativa da idade das plantas baseou-se no que foi observado por Silva et al., (2010), para o mamoeiro Golden, nas mesmas condições de plantio e época do ano contemplados neste trabalho.

Para as amostras de sementes também foram realizadas duas amostragens nas quais foram coletados frutos representativos das duas fases de desenvolvimento avaliadas neste estudo. Em cada uma foram utilizadas as sementes de cinco frutos imaturos, coletados aos 90 dias pós antese (DPA), e de cinco frutos amostrados no estágio de maturação correspondente ao segundo dia pós-colheita (DPC), representativos da fase em que os frutos apresentam-se fisiologicamente maduros.

Figura 1. Plantas e frutos do mamoeiro analisados em duas amostragens biológicas distintas. Foram coletadas amostras de plantas em duas idades diferentes (3 e 6 meses após a semeadura). Frutos imaturos (30, 60, 90 e 110 DPA) e maduros (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 DPC).

No laboratório, as amostras de folha, caule, raiz e de frutos fisiologicamente imaturos foram imediatamente lavadas, secas ao ar em temperatura ambiente, congeladas separadamente em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C.

3.2 MEDIDAS DA RESPIRAÇÃO, PRODUÇÃO DE ETILENO E FIRMEZA DA POLPA

As medidas de CO₂ e etileno foram feitas de acordo com Fabi et al. (2007). Diariamente, quatro frutos foram pesados e acondicionados isoladamente em frascos hermeticamente fechados de aproximadamente 2,8L e após uma hora foram retiradas amostras de 10 mL de etileno e 1 mL de CO₂ do *headspace* para a análise da composição desses gases por cromatografia gasosa. Para a análise de etileno foi utilizado o detector de ionização de chama e para a análise de CO₂, o detector de condutividade térmica.

Para a análise da firmeza dos frutos foi utilizado um penetrômetro manual (EFFEGI, FT-327) com ponteira de 8 mm para medida da força de penetração no tecido. Foram utilizados cinco frutos por dia, sendo realizadas seis medições no mesocarpo de cada fruto, tomadas na região equatorial em pontos equidistantes. A média dos valores foi expressa em Newton (N). Amostras de tecido desses frutos (casca e polpa) foram coletadas durante todos os dias analisados, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para serem utilizadas posteriormente nas análises moleculares.

3.3 PROSPECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS DE PGIPs

O levantamento inicial das sequências de prováveis proteínas inibidoras de poligalacturonases fúngicas (PGIPs) presentes no genoma do mamoeiro foi feito através de prospecção *in silico* do genoma (WGS; Whole Genome Shotgun) dessa planta (MING et al., 2008) por comparação com sequências de PGIPs de outros organismos já descritas no GenBank. A busca baseou-se nos cerca de 92% do genoma do mamoeiro já descritos e depositados no GenBank, sequenciados a partir do mamoeiro feminino da cultivar 'SunUp'.

Para a comparação, foram selecionadas as sequências nucleotídicas de PGIPs de maçã (AY347793.1), banana (DQ417334.1), uva (AF499451), kiwi (Z49063.1), melão (AY288911), pêra (L09264), pêssego (EF409977), damasco (AF020785), tomate (L26529) e framboesa (AJ620355), disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essa busca foi inicialmente baseada na sequência nucleotídica e após a tradução na respectiva sequência de

aminoácidos, por meio da ferramenta BCM Search Launcher (<http://ca.expasy.org/tools/>), foi utilizada a ferramenta tBlastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a pesquisa também na base de dados de proteínas.

Para o alinhamento das sequências candidatas de mamão com as de outros frutos foi utilizado o programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), tanto para a sequência nucleotídica quanto para a sequência proteica. Para as análises de predição de peptídeo sinal foi utilizado o servidor SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin>) e para a busca da provável sublocalização celular das proteínas de PGIP do mamoeiro foi utilizado o servidor WOLFPSORT, disponível em: <http://wolfpsort.seq.cbrc.jp>.

A estrutura das proteínas codificadas pelos genes de *Cppgip4* e *Cppgip6* foi predita a partir do servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) que utiliza modelagem proteica por homologia com as estruturas depositadas no banco de dados. O tamanho da proteína e o seu valor de ponto isoelétrico (pI) foram preditos pela ferramenta Compute pI/MW (BJELLQVIST et al., 1993; GASTEIGER et al., 2005) presente no servidor Expasy (web.expasy.org).

Para a identificação das regiões codificadoras dos prováveis genes, foi utilizado o software Genamics Expression disponível em <http://genamics.com/expression/index.htm>.

O desenho dos iniciadores foi feito com o programa Primer3, disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, utilizando como critérios a temperatura de dissociação (T_m), a diferença máxima de 1°C entre as T_m do par de iniciadores, a ausência de dímeros de iniciadores ou alças. Para a análise da qualidade dos iniciadores foi utilizado o NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) capaz de prever a formação de estruturas primárias ou secundárias, como a formação de grampos, dímeros, dímeros cruzados e regiões palindrômicas, além de dar uma previsão quantitativa da eficiência dos iniciadores.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico do mamoeiro foi extraído de folhas jovens empregando o

método desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações descritas por Fabi et al. (2009).

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para a extração de RNA total foram utilizadas amostras de folha, caule e raiz de plantas com três e seis meses a partir da semeadura, de polpa e casca de frutos aos 30, 60, 90 e 110 dias após a antese e de frutos entre 1 DPC e 9 DPC e de sementes de frutos aos 90 DPA e aos 2 DPC.

Cem miligramas do tecido foram pulverizados em nitrogênio líquido e adicionados a 500 µL de Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) gelado, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 5 minutos, sendo centrifugada a 12.000 x *g* também a temperatura ambiente durante 4 minutos e o sobrenadante coletado em um novo microtubo livre de RNase. A esse foram acrescentados 100 µL de NaCl 5 M, agitado em vórtex e adicionados 300 µL de clorofórmio gelado. Após mistura por inversão, a amostra foi centrifugada novamente a 12.000 x *g* a 4 °C durante 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado igual volume de 2-isopropanol, sendo agitado por inversão e mantido por 10 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi novamente centrifugada a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com 1 mL de álcool etílico 75%. Após nova centrifugação a 12.000 x *g* por 1 minuto a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 30 µL de água estéril, sendo posteriormente acondicionado em banho de gelo para a quantificação e verificação da qualidade e integridade dos ácidos nucléicos extraídos.

3.6 PURIFICAÇÃO

Após a extração do RNA, as amostras foram purificadas com o kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen), para remoção de traços de DNA presentes na amostra a partir do tratamento com DNase. Em um volume de 100 µL de amostra foram adicionados 350 µL de tampão RLT e, após a mistura, 250 µL de etanol absoluto foram adicionados ao tubo. Toda a amostra foi transferida para a coluna de purificação e imediatamente centrifugada a 8.000 x *g* durante 15 s. À coluna foram

adicionados 350 µL de tampão RW1 esta foi centrifugada na mesma condição anterior para a lavagem da membrana. Após o descarte do filtrado, adicionaram-se à coluna 80 µL de um pré-mix composto de 10 µL de DNase I e 70 µL de água, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, 350 µL de tampão RW1 foram adicionados à coluna e esta foi novamente centrifugada. A coluna foi então lavada duas vezes com 500 µL de tampão RPE e centrifugada a 8.000 x *g* durante 2 minutos, seguida de tratamento da membrana com 50 µL de água livre de RNases. O eluato contendo o RNA purificado foi recolhido por centrifugação a 8.000 x *g* durante 1 minuto. As amostras foram congeladas em ultrafreezer até o momento das análises.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A quantidade de RNA foi calculada por espectrofotometria (SAMBROOK et al., 1989) considerando que uma amostra contendo 40 µg/mL de RNA apresenta valor de absorbância igual a 1,0 a 260 nm. Também foi avaliada a integridade do RNA total em gel de agarose 1% corado com 'SYBR Safe DNA Gel Stain' (Invitrogen®) na diluição 1:10.000 (v/v) e visualizado sob luz ultravioleta. Somente amostras de RNA total com razões A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas na síntese de cDNA.

3.8 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) FITA SIMPLES

Para a síntese do cDNA utilizado nas reações de PCR quantitativa, foi utilizado o protocolo descrito no kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas), baseado na utilização de uma transcriptase reversa e de um *random hexamer primer* para a síntese do cDNA a partir de todo o RNA. Para o início da reação, partiu-se de 1 µg de RNA total das amostras dos diferentes tecidos das plantas e das sementes. Os componentes foram misturados em microtubo e passaram por incubação em termociclador (Bio-Rad, C1000 Thermal Cycler) a 65 °C por 5 minutos para a etapa de pareamento. Após a adição dos outros componentes da reação, procedeu-se a uma sequência de etapas de incubação a 25 °C por 5 minutos para pareamento do iniciador, extensão da primeira fita de cDNA a 42 °C por 60 minutos e inativação da transcriptase reversa a 70 °C por 5 minutos.

3.9 INICIADORES

Os iniciadores utilizados para testar a amplificação do fragmento completo para cada um dos genes de PGIPs do mamoeiro estão descritos a seguir:

Tabela 1. Sequência dos iniciadores

Gene	Orientação	Sequência
<i>Cppgip4</i>	senso	5'-ATG AAA GCC CTT CTC CAC TTC ATC G-3'
	antisenso	5'-TTA CTT CAG CTT GCA TGG TTG CAG A-3'
<i>Cppgip6</i>	senso	5'-ATG GAA CCC CTT CAA AAA TTT TCC-3'
	antisenso	5'-CTT GCA GGG CGG AAG AGG AGC A-3'

Para a confirmação da amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) (SAMBROOK et al., 1989), contendo SYBR Safe. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen®) como padrão. Uma vez detectada a presença do amplicon de interesse foram feitas PCR preparativas com finalidade de permitir a purificação das bandas de DNA de interesse.

3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a amplificação do fragmento de *Cppgip4* e *Cppgip6* a partir do cDNA e do DNA genômico, a reação consistiu de uma alíquota de 1 µL da reação de cDNA descrita no item 3.8, 10 µM de cada iniciador, 50 µM de dNTP, MgCl₂ 0,7 mM e 1 unidade da enzima *Taq* polimerase em um volume total de 20 µL de reação. Foram utilizadas amplificações por PCR com 35 ciclos, consistindo das seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C / 4 min, desnaturação a 94 °C / 30 s, pareamento dos iniciadores a 55 °C (*Cppgip4*) ou a 58 °C (*Cppgip6*) por 30 s, extensão a 72 °C / 1 min e 20 s e extensão final a 72 °C/4 min.

3.11 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA PCR

Após a PCR, as bandas dos amplicons foram separadas por eletroforese em gel de agarose, recortadas e purificadas com o kit Nucleospin Extract II (Macherey-

Nagel, MN). Os fragmentos excisados foram colocados em tubos de microcentrífuga e adicionados ao tampão NT na proporção de 200 μ L de tampão para cada 100 mg de gel. As misturas foram incubadas a 50 °C até a completa dissolução dos fragmentos de gel. As amostras foram misturadas em vórtex por 2 a 3 minutos e aplicadas em colunas inseridas em tubos coletores, os quais foram centrifugados a 11.000 x g por 1 min. O material filtrado, depositado no tubo coletor, foi descartado e a coluna de sílica foi lavada com 600 μ L de tampão NT3 e procedeu-se a nova centrifugação na mesma condição anterior, sendo o conteúdo retido no tubo coletor novamente descartado. Foram adicionados mais 200 μ L de tampão NT3 às colunas, seguida de centrifugação para nova lavagem da sílica. Por fim, as colunas foram colocadas dentro de novos tubos e a elas foram adicionados 50 μ L de tampão de eluição NE, sendo incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada por 1 minuto a 11.000 g para eluição dos produtos de amplificação purificados.

3.12 CLONAGEM

Os fragmentos de DNA amplificados pela PCR e purificados com o Kit Nucleospin Extract II foram ligados ao vetor pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit-Fermentas). Para a transformação e propagação do DNA plasmidial, as reações de ligação foram utilizadas para transformação de células competentes de *Escherichia coli* (linhagem TOP 10 - Invitrogen, Carlsbad, CA) por choque térmico, segundo as instruções do fabricante.

Um volume de 8 μ L de cada reação de ligação foi adicionado a 40 μ L de suspensão de células competentes, as quais foram incubadas em gelo por 20 minutos, a 42 °C durante 30 segundos e imediatamente transferidas para banho de gelo. Após adição de meio LB pré-aquecido a 37 °C (SAMBROOK et al., 1989), as suspensões celulares foram incubadas em banho a 37 °C por 1 hora com agitação suave e constante. As suspensões foram plaqueadas em meio sólido Luria Bertani (LB)-ágar (SAMBROOK et al., 1989) contendo ampicilina na concentração de 50 μ g/mL e suplementadas com 0,5 mM de IPTG, 80 mg mL⁻¹ de X-Gal e incubadas a 37 °C durante 12 horas. Um controle contendo apenas meio LB e células competentes também foi plaqueado, bem como os controles positivo e negativo presentes no kit, na presença e ausência de inserto, respectivamente. As colônias

contendo os indivíduos transformados foram observadas após incubação a 37 °C por 16 horas.

Dentre as colônias que cresceram, algumas foram isoladas das placas e transferidas para meio LB líquido contendo ampicilina na mesma concentração anterior e incubadas a 37 °C durante 1-2 horas. A partir das culturas crescidas em meio líquido foi realizado um “PCR colony”, para a confirmação da presença do fragmento de interesse no plasmídeo, em condições de reação iguais às utilizadas na reação de PCR para amplificação do fragmento. Após esse período, as amostras foram repicadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina e crescidas a 37 °C por um período de 16 horas com agitação leve e constante para a produção de células para a purificação dos plasmídeos.

3.13 MINI-PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS E DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Após centrifugação a 10.000 x *g* a temperatura ambiente os precipitados das culturas de bactérias transformadas foram lisados e os plasmídeos recombinantes foram purificados de acordo com o sistema de purificação de plasmídeo GENEJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Os produtos das mini-preparações foram quantificados por espectrofotometria e analisados por eletroforese em gel de agarose. Para a confirmação da presença dos plasmídeos contendo os fragmentos de interesse, os mesmos foram linearizados com as enzimas Kpn I e Apa I (Amersham Pharmacia-GE Healthcare) e os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com ‘SYBR Safe DNA Gel Stain’ (Invitrogen®) na diluição 1:10.000 (v/v) e visualizado sob luz ultravioleta.

3.14 SEQUENCIAMENTO

A etapa de sequenciamento dos amplicons foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano- CEGH/USP. Alíquotas de 100 ng/μL dos plasmídeos purificados das amostras de frutos com 90 DPA, 3 DPC e 8 DPC foram utilizadas para amplificação com os iniciadores M13 *senso* (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') e *reverso* (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') e também com os iniciadores específicos *Cppgip4 senso/reverso* e *Cppgip6 senso/reverso* de acordo com o kit

“Thermo Sequenase™ Cy™5 Dye Terminator” (Amersham Biosciences™) (SANGER et al., 1977). O programa utilizado para as reações foi de 35 ciclos a 96 °C / 10 s, 50 °C / 5 s e 60 °C / 4 min.

A partir das reações de sequenciamento, os eletroferogramas gerados foram analisados com o software Alfin®2.10 (Amersham Pharmacia Biotech®) para determinação das sequências consenso das amostras de DNA. Os consensos obtidos foram submetidos à comparação com os dados do GenBank, por meio do *software* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1990), disponível na Internet, sendo também verificados quanto à presença de fragmentos de vetor no resultado do sequenciamento através do sistema VecScreen.

3.15 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA (qPCR)

Para as reações de PCR quantitativa foram utilizados iniciadores específicos para amplificação de trechos de *Cppgip4* e *Cppgip6*, desenhados a partir da análise dessas sequências através do programa Frodo Primer3, disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, utilizando como critérios a temperatura de dissociação (T_m), a diferença máxima de 1°C entre as T_m do par de iniciadores e a ausência de dímeros de iniciador ou grampos. A partir das diversas sequências geradas pelo Frodo Primer 3, a análise da qualidade dos iniciadores candidatos foi verificada por meio da ferramenta Oligo Analysis Tool, disponível em: <http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx> e que possibilitou analisar a presença de dímeros de iniciadores, bem como determinar a quantidade (%) de CG e a temperatura de dissociação. A presença de grampos dentro da sequência foi verificada através do programa MFold, disponível em: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>. As combinações dos iniciadores sintetizados permitiram amplificar sequências de 117 pares de base (pb) para o *Cppgip4* e 118 pb para o *Cppgip6* e estão descritos na tabela 2.

O método de PCR quantitativa foi realizado utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG with ROX (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

As reações foram conduzidas em aparelho termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett research), em quadruplicata técnica, tanto para o controle negativo quanto para cada amostra analisada.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores para qPCR

Gene	Orientação	Sequência
<i>Cppgip4</i>	senso	5'-CCG GAT CGA CCA GCT AAA TA-3'
	antisenso	5'-CCG GTG AGG TTT GTG AGT TT-3'
<i>Cppgip6</i>	senso	5'-CAG TTC CCG ACT TTC TCA GC-3'
	antisenso	5'-CGG ATG GAT GTA AGG TTT GG-3'
β -actina	senso	5'-CGT GAC CTT ACT GAT CAC TTG-3'
	antisenso	5'-GTC AAG GGC AAT GTA AGA CAG-3'
UBQ	senso	5'-ACTCACCGGCAAGACCAT-3'
	antisenso	5'-GTGGAGAGTCGATTCTTTTG-3'
TEF	senso	5'- GTTAAGAACGTTGCCGTGAAG-3'
	antisenso	5'- ATGTGAAGTTGGCTGCTTCCT-3'

Foram utilizados os genes constitutivos da β -actina (ACT) (FABI et al., 2012), do fator de alongação (TEF), para o tomateiro (número de acesso: X14449) e que se alinha à sequência *Carica papaya* chromosome LG9 contig_12183, e da ubiquitina (UBQ) (tabela 2) desenhado a partir da sequência *Carica papaya* chromosome LG10 contig_22710. Os dois últimos partiram de sequências já descritas por Guo et al. (2012). Os três genes foram utilizados como controles endógenos e normalizadores dos cálculos de expressão relativa de *Cppgip4* e *Cppgip6*, e um controle negativo NTC (*No Template Control*) contendo todos os reagentes exceto o cDNA. A partir dos cDNAs provenientes da reação da transcriptase reversa foram utilizados 2 μ L nas reações de amplificação, às quais acrescentaram-se 5,0 μ L de Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG with ROX, 0,2 μ L de cada iniciador 10 μ M e água DEPC em quantidade suficiente para um volume final de 10 μ L.

A programação utilizada no termociclador foi de 50 °C/2 min para ativação da enzima uracil-DNA glicosilase (UDG), 95 °C/5 min para inativação da UDG e ativação da *Taq* Polimerase, 40 ciclos de 95 °C/15 s para desnaturação; 60 °C/30 s para pareamento dos iniciadores; 72 °C/30 s para extensão.

Para a verificação da especificidade da amplificação e confirmação da ausência de formação de dímeros do iniciador ou qualquer outro produto inespecífico, as reações foram finalizadas com a determinação da temperatura da curva de dissociação do produto, que utilizou uma rampa de variação de 72 °C a 95 °C. A temperatura apresentada na curva de dissociação de cada gene deveria ser a mesma para todas as reações, de modo a indicar a pureza do produto gerado. O

software (Rotor Gene 6.0 - Corbett) utilizado para as análises do ciclo limiar (Ct: Cycle threshold”) e da temperatura de dissociação foi o do próprio equipamento.

A eficiência das reações foi calculada a partir das curvas geradas nas reações de calibração de cada gene. Nessas reações foram utilizadas diluições seriadas até 1:1000 do material sem diluição (“sd”) consistindo de um *pool* de cDNA de todos os pontos amostrados. A partir do resultado das reações foi traçada uma curva de eficiência levando-se em consideração o logaritmo da quantidade de RNA, referente às diluições do cDNA e o Ct da reação. Foi determinada a equação da reta através de regressão linear, integrando os valores de Ct no eixo das ordenadas e o logaritmo da quantidade de RNA no eixo das abscissas. A fórmula da regressão linear desta reta-padrão ($y=mx + b$) serviu de base para os cálculos posteriores na determinação do R^2 , cujo valor máximo é igual a 1, e da Eficiência (E) da reação, calculada a partir da inclinação da reta (*Slope*) e que é expressa pela equação: $E=10^{(-1/slope)}$.

A expressão gênica foi determinada pelo cálculo da expressão relativa a partir dos valores de razão determinados para o 1 DPC, adotado como valor de referência, tanto para os pontos de análise do desenvolvimento do fruto (30 a 110 DPA) quanto para os pontos referentes à pós-colheita (2 DPC ao 9 DPC). Para o cálculo da quantificação relativa dos genes-alvo foi utilizada a seguinte equação, proposta por Pfaffl (2001):

$$\text{Razão} = \frac{E(\text{alvo})^{\Delta Ct_{\text{alvo}}(\text{controle- amostra})}}{E(\text{referência})^{\Delta Ct_{\text{referência}}(\text{controle- amostra})}}$$

Nessa equação a razão representa a expressão relativa do gene alvo, sendo E_{alvo} a eficiência de transcrição do gene alvo, $E_{\text{referência}}$ a eficiência de transcrição do gene de referência (β -actina, UBQ ou TEF), ΔCt_{alvo} a diferença entre o Ct do gene alvo da amostra controle– Ct do gene alvo da amostra desconhecida e $\Delta Ct_{\text{referência}}$ a diferença entre o Ct do gene de referência da amostra controle – Ct do gene de referência da amostra desconhecida.

Para a determinação da estabilidade de expressão dos genes normalizadores utilizados para o cálculo das reações foi utilizado o programa RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>) para validar a estabilidade do gene para as amostras dos tecidos avaliados. O programa integra os principais sistemas atuais

de análise de estabilidade de genes (geNorm, NormFinder, BestKeeper, e o método do ΔC_t comparativo) para compará-los e classificá-los com base em métodos diferenciados atribuídos individualmente e que levam em consideração os valores de C_t das amostras avaliadas. Apesar de não ter sido calculada a expressão relativa para os outros tecidos (raiz, caule, folha e semente), os valores de expressão dos genes constitutivos também foram obtidos e seus resultados também foram analisados pelo programa para que se determinasse o grau de estabilidade dos mesmos.

A expressão gênica absoluta, ou seja, o número de cópias dos transcritos dos genes foi determinada com base em curvas-padrão definidas para cada um dos genes, as quais foram construídas através de diluições dos respectivos plasmídeos contendo os insertos de *Cppgip4* e de *Cppgip6* de modo a prover concentrações conhecidas da respectiva sequência-alvo da amplificação. Os DNA plasmidiais contendo os insertos dos gene *Cppgip4* e de *Cppgip6*, clonados no vetor pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit- Fermentas), foram adotados como os padrões de calibração desses genes. A quantidade de DNA presente nessas amostras foi medida por espectrofotometria e, após a determinação da concentração do DNA, foram feitas as diluições seriadas desse material. Para cada gene, a partir dos valores do C_t equivalentes às diferentes diluições do DNA, foi traçada uma curva padrão determinando a relação linear entre os valores de C_t e a quantidade da amostra, gerando uma equação da reta utilizada para os cálculos do número de cópias (WONG e MEDRANO, 2005). Da equivalência entre o C_t e a quantidade de DNA plasmidial em μg , o número de cópias de transcrito foi determinado com base nos cálculos que levam em consideração as diferentes diluições do DNA na curva padrão e baseiam-se nas equações descritas por Godornes et al. (2007) e modificada para os diferentes padrões de análise:

Equação 1:

$$\text{Número de cópias / mg de tecido} = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ (moléculas/mol)} \times \left(\frac{\text{Quantidade de DNA } (\mu\text{g})}{\text{Número de pares de base} \times 660 \text{ Daltons}} \right) / \text{massa de tecido (mg)}$$

Equação 2:

$$\text{Número de cópias / } \mu\text{g de RNA} = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ (moléculas/mol)} \times \left(\frac{\text{Quantidade de DNA } (\mu\text{g})}{\text{Número de pares de base} \times 660 \text{ Daltons}} \right) / \text{quantidade de RNA } (\mu\text{g})$$

Nas equações acima, a expressão absoluta é representada pelo número de cópias por massa do tecido (equação 1) em mg ou pela quantidade de RNA total utilizado na síntese de cDNA (equação 2) em μg , considerando-se a quantidade de DNA utilizado para a reação, o número de pares de bases total da molécula de DNA, ou seja, a soma do tamanho do plasmídeo mais o inserto em pares de bases, de acordo com o apresentado por Forlenza et al.(2012), e assumindo que o peso médio de 1 par de bases corresponde a 660 Daltons.

3.16 PRODUÇÃO DE PGIP RECOMBINANTE EM *Pichia pastoris*

3.16.1 Amplificação das seqüências de PGIP

Para as tentativas de amplificação das seqüências de PGIPs para expressão na levedura, foram construídos iniciadores contendo adaptadores com sítios de restrição das enzimas KpnI e NotI, indicados pelos nucleotídeos sublinhados nas seqüências abaixo:

PGIP4_Kpn1: 5'-AGAGAGGGTACCGAGCTCTGCAACACAGAAGAC-3'

PGIP4_Not1: 5'-AGAGAGCGGCCCGCCTTCAGCTTGCATGGTTGCAG-3'

PGIP6_Kpn1: 5'-AGAGAGGGTACCGACCGCTGCAACCCAGAAGAC-3'

PGIP6_Not1: 5'-AGAGAGCGGCCCGCCTTGCAGGGCGGAAGAGGAG-3'

O desenho dos iniciadores baseou-se nas regiões dos genes preditas para a codificação dos polipeptídeos maduros, sendo feita a partir da análise das seqüências por meio da ferramenta SignalP, disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Para a extração do RNA foi utilizado o protocolo descrito no item 3.5 e para a síntese do cDNA o protocolo apresentado no item 3.8. Foi utilizada a amostra de 1 DPC como molde para a reação de PCR. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg de

RNA, de acordo com a reação descrita no protocolo do kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas), sendo utilizado um iniciador oligo(dT)₁₂₋₁₈.

Para a PCR foi utilizado o Kit KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen) consistindo de 0,3 µM de iniciadores, 1,5 mM de MgSO₄, 0,08 mM de dNTPs, 2 µL de cDNA molde referente ao RNA total extraído dos frutos amostrados a 1 DPC e 1 unidade de *KOD Hot Start DNA Polimerase* em 50 µL de volume de reação. A programação utilizada foi de: 94 °C / 2 min, seguido de 29 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C / 20 s, pareamento a 65 °C / 10 s e de extensão a 70 °C por 15 s, mantidos a 4 °C / 5 min.

Os fragmentos obtidos pela PCR foram purificados com Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey-Nagel).

3.16.2 Clonagem e expressão em *Pichia pastoris*

Para a construção dos sistemas de expressão foram utilizados os serviços da empresa GenScript, New Jersey, USA (<http://www.genscript.com/>) a fim de garantir uma melhor eficácia de expressão dos genes. O sistema foi otimizado por construção de fragmentos sintéticos a partir das sequências descritas que contaram com a otimização de códons sem que houvesse alteração na sequência de aminoácidos do polipeptídeo, e que tornassem a expressão dos genes mais eficaz em levedura. Os alinhamentos entre as sequências originais de *Cppgip4* e *Cppgip6* e aquelas otimizadas para expressão em *P. pastoris* podem ser verificados no Apêndice, Figuras 26 e 27. Essa otimização baseou-se nas sequências definidas para *Cppgip4* e *Cppgip6* e foram mantidas algumas de suas características, como a presença dos sítios de restrição que seriam posteriormente utilizados na digestão dos fragmentos. As otimizações consistiram não apenas na otimização de códons como também no ajuste da quantidade de nucleotídeos guanina e citosina (GC) e na remoção de sequências repetidas.

As sequências construídas para a expressão em levedura foram inseridas no vetor pPICZαB (Figura 2) logo após sua síntese. Esse vetor apresenta fator alfa para exportação das proteínas para outros compartimentos ou para o meio extracelular, sítios de restrição enzimática, gene que confere resistência ao antibiótico zeocina (ZEO), o gene *aox1* que possibilita a indução da expressão da proteína recombinante por metanol e uma região que contém um tag de histidina (6xHis).

Após obter as construções, as mesmas foram clonadas em *E. coli* competentes (TOP 10 F', Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante.

Figura 2. Mapa do vetor de expressão pPICZalfaB (3593 pb - Invitrogen).

Após a reação de transformação, as reações foram plaqueadas em placas de cultura contendo meio sólido Luria Bertani Low Salt (LB-LS)-ágar (SAMBROOK et al., 1989) suplementado com 25 µg/mL do antibiótico zeocina para a seleção das bactérias transformadas.

As colônias positivamente transformadas crescidas nas placas foram verificadas por meio de “PCR colony” e replicadas em LB Low Salt contendo zeocina durante 180 minutos sob agitação a 650 rpm a 37 °C e após o crescimento foram submetidas à PCR para a confirmação das transformações. Foram utilizados os iniciadores específicos para cada sequência e também os iniciadores 5'AOX (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') e 3'AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') que pareiam em regiões dentro do vetor e externas às sequências. A identidade destas sequências e o correto posicionamento em relação às sequências regulatórias do vetor foram confirmados após o seu sequenciamento, realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano.

A preparação das células de *Pichia pastoris* da cepa GS115 foi realizada a partir de uma pré-cultura composta por 10 mL de meio YPD (preparado a partir de extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%). Esta pré-cultura foi incubada a

29°C durante uma noite em agitação de 250 rpm até que a OD_{600nm} atingisse um valor de 0,1 a 0,2 para que fosse posteriormente desdobrada em 10 mL de meio YPD e incubada sob agitação de 250 rpm a 29 °C para alcançar a uma OD_{600nm} valores ente 0,6 e 1,0.

Paralelamente à preparação das células da levedura, as construções foram linearizadas nas regiões dos sítios de restrição das enzimas KpnI e NotI (3.16.1), cujas sequências foram mantidas na fase de otimização dos códons para que ocorresse digestão apenas na região do plasmídeo.

3.16.3 Transformação de *Pichia pastoris* GS115 por eletroporação

As células de *Pichia pastoris* contidas em meio YPD foram incubadas para crescimento por 30 horas até que a densidade ótica a 600 nm estivesse entre 1,3 e 1,5. A cultura foi mantida em gelo durante 10 minutos e transferida para tubos de centrífuga já resfriados que foram submetidos à centrifugação a 1500 g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com água Milli-Q autoclavada e resfriada e novamente centrifugado a 1.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Este passo foi repetido mais duas vezes, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 10 mL de sorbitol 1 M autoclavado e gelado. Após adição do sorbitol a mistura foi centrifugada a 1.000 x g por 5 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de sorbitol 1 M.

Alíquotas de 100 µL de suspensão de células de *P. pastoris* foram transformadas por eletroporação (*Bio Rad Gene Pulser*) com 20 µg de plasmídeo linearizado utilizando-se as seguintes condições: 1500 V, 200 Ω e 25 µF. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado à cubeta 1 mL de sorbitol e a mistura foi transferida para outro tubo, o qual foi submetido a incubação a 30 °C durante 60 minutos, sem agitação. Após esse tempo, adicionou-se meio YPD e a mistura foi incubada a 30 °C, com agitação de 200 rpm por 60 minutos.

Os transformantes foram selecionados em placas de cultura contendo meio seletivo YPDS/Ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1M e ágar 2%) contendo antibiótico zeocina na concentração de 100 µg mL⁻¹. Após três dias de crescimento em estufa a 37 °C, as colônias positivas foram submetidas à PCR utilizando-se os iniciadores 5'AOX e 3'AOX para a verificação das colônias positivamente transformadas.

3.16.4 Determinação do fenótipo Mut^s ou Mut⁺ das colônias

Para a determinação do fenótipo dos clones crescidos nas placas a fim de determinar as condições de crescimento e indução, algumas das colônias foram semeadas em placas contendo meio MMH (Minimal Methanol $\pm$ Histidine) e MDH (Minimal Dextrose Medium $\pm$ Histidine) e incubadas a 28°C por dois dias. A diferença na velocidade de crescimento dos clones no meio indicou o fenótipo dos mesmos. Alterações fenotípicas são decorrentes da forma com que ocorre a inserção do gene no plasmídeo, modificando a forma como o metanol é metabolizado e por consequência o crescimento e indução da expressão proteica. Clones que crescem mais lentamente foram identificados como sendo Mut^s (Methanol ut^{il}ization slow), diferentemente dos Mut⁺ (Methanol ut^{il}ization) que crescem mais rapidamente em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Existem ainda os clones Mut⁻ (Methanol ut^{il}ization negative) onde *aox1* e *aox2* estão inativos e a linhagem não metaboliza metanol. Clones Mut^s não possuem o gene *aox1* ou este é interrompido e por isso não tem capacidade de metabolizar o metanol com tanta efetividade quanto os clones que apresentam o fenótipo Mut⁺.

A detecção do fenótipo das colônias é importante para que se defina qual o protocolo mais indicado para a indução da expressão.

3.16.5 Crescimento de células transformadas e indução da expressão

Os transformantes positivos foram selecionados e inoculados em 250 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%; peptona 2%; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0; 1,34% de YNB (yeast nitrogen base), 0,00004 % de biotina e glicerol 1%) seguido de incubação a 30 °C com agitação por 17 horas para gerar biomassa. As células foram centrifugadas a 1.000 x *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 62,5 mL de meio BMMY (extrato de levedura 1%; peptona 2%; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0; 1,34% de YNB, 0,00004 % de biotina e metanol 0,5%) e incubado a 30 °C com agitação por 4 dias para indução da expressão. A cada 24 horas foi adicionado metanol em quantidade suficiente para a concentração final de 2% para manutenção das condições e indução.

3.16.6 Concentração das amostras

As células induzidas descritas no item 3.16.5 foram centrifugadas a $1.045 \times g$ por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido em um tubo separado do precipitado e ambos foram acondicionados a -20 °C. As amostras do sobrenadante foram posteriormente precipitadas em sulfato de amônio até a saturação de 80% e concentradas em colunas Centriprep 10 KDa. O conteúdo de proteína total foi estimado pelo método de Bradford (1976) com o reagente da Bio Rad, utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma) como padrão.

3.17 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras de proteína dos extratos (sobrenadante e precipitado) das culturas e das etapas de purificação foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), como descrito por Sambrook et al. (1989). Para visualização das proteínas os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1%) em solução aquosa de ácido acético 7% e etanol 40%, e descoradas em solução aquosa de ácido acético 7,5% e etanol 5%.

3.18 WESTERN BLOTTING

Para o experimento de imunodeteção (Western blotting), foi utilizada metodologia padrão conforme descrito por SAMBROOK et al., (1989). As amostras do extrato de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 12,5%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond C (Amersham). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em tampão PBS contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA) por 2 horas sob agitação, sendo então lavadas com PBST (Tween 20 0,1%). Posteriormente, as membranas foram incubadas com PBST contendo o anticorpos primários específicos de PGIP de pera (1:2000) (POWELL et al., 2000) e de feijão (1:5000) (MATTEI et al., 1996), gentilmente cedidos pelo professor John Labavitch (Universidade da California, Davis, USA) e pelo Dr. Gerardo Gutierrez-Sanchez (Universidade da

Georgia, USA), respectivamente. Após a incubação durante 90 minutos à temperatura ambiente, as membranas foram então lavadas repetidamente com PBST. A seguir, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Cy3 (antibody goat anti-rabbit IgG conjugated to Cy3 – Invitrogen) e foram agitadas durante 60 minutos ao abrigo da luz. A lavagem final consistiu em três repetições de PBS e posteriormente as bandas foram visualizadas por fluorescência com o sistema Versadoc 4000MP (Bio-Rad). Para a análise mais específica das possíveis bandas de PGIPs derivadas das construções testadas para a expressão em *Pichia pastoris* formadas foi utilizado o anticorpo monoclonal His-Tag (Novagen) (1:2000) que se liga à proteínas que apresentam cauda de histidina em sua sequência polipeptídica.

3.19 ENSAIO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE PGIP POR DIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

Para o ensaio de atividade inibitória de PGIPs, os extratos vegetais de mamão foram obtidos a partir de amostras de casca e polpa das duas amostragens biológicas e representativas de alguns dos pontos do desenvolvimento do fruto (30 e 110 DPA) e de amadurecimento (1, 5, 9 DPC) para que se pudesse traçar um perfil da capacidade inibitória de PGIPs presentes em ambos os tecidos. As amostras de polpa e de casca foram pulverizadas com nitrogênio líquido e misturadas na proporção 1:4 (m/v) ao tampão acetato de sódio 20mM pH 4,7 contendo NaCl 1M e coquetel de inibidores de protease (P-9599, Sigma). Esta mistura foi agitada a 4°C durante 4 horas e em seguida filtrada em 4 camadas de papel de filtro (Miracloth). O filtrado foi coletado, centrifugado a 9.000 x g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio até saturação de 90%. As amostras foram então centrifugadas nas mesmas condições anteriores e os precipitados foram ressuspensos em 5mL tampão acetato de sódio 20mM (pH 5,5), sendo dialisados por 12 horas contra o mesmo tampão. Após a diálise, as amostras foram recolhidas, centrifugadas a 9.000 x g durante 30 minutos a 4°C e concentradas em colunas Centriprep 10 KDa para a obtenção de um menor volume do extrato. Para o armazenamento das amostras a -20°C, foi adicionado glicerol a 15%.

A concentração de proteínas dos extratos foi estimada pelo método de Bradford (1976) sendo empregada uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA).

O ensaio de atividade inibitória de PGIP foi realizado em triplicata de acordo com o proposto por Taylor e Seccor (1988), no qual são empregadas placas contendo meio sólido preparado a partir de uma mistura contendo 1% de agarose, 0,1g/L de ácido poligalacturônico de citros (Sigma), 3,65 g/L de EDTA e 0,2 g/L de azida sódica. Essa mistura foi dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), aquecida até a completa fusão da agarose e, ao atingir 60°C, foi vertida em placas de petri até sua solidificação. Após a solidificação da agarose, foram perfurados poços de 4 mm de diâmetro no gel e a esses poços foram adicionados 30 µL de uma mistura contendo pectinase fúngica comercial de *Aspergillus niger* (Sigma), composta de uma mistura de pectinatranseliminase, poligalacturonase e pectinesterase, e o extrato de mamão contendo 30 µg de proteínas. Os controles e as misturas de reação aplicados nas placas estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Controles e misturas de reação aplicados nos poços para análises da atividade inibitória de PGIP.

Controles		descrição	Misturas de reação
Controle 1	Positivo para pectinase exógena		1 µL de pectinase e 29 µL de tampão de ressuspensão
Controle 2	Negativo para reação enzimática		30 µL de tampão de ressuspensão
Controle 3	Negativo para pectinase exógena		1 µL de pectinase fervida durante 10 minutos e 29 µL de tampão de ressuspensão
Controle 4	Positivo para pectinase endógena		30 µL de extrato proteico
Controle 5	Positivo para pectinase exógena e negativo para pectinase endógena		1 µL de pectinase e 29 µL de extrato proteico fervido durante 10 minutos
		Amostras	1 µL de pectinase e 29 µL de extrato proteico

Após as amostras e os controles terem sido aplicados nas placas, as mesmas foram mantidas durante 20h a 37°C e reveladas por adição de solução de vermelho de rutênio 0,05% (Sigma). Após 1 h de incubação na solução, as placas foram

exaustivamente lavadas em água destilada por 1h para remover o excesso de vermelho de rutênio não ligado. A capacidade inibição das PGIPs foi calculada a partir da medida do diâmetro dos halos formados pela reação. A partir desse valor de diâmetro foram determinadas também as medidas de área do halo formado e da intensidade de cor dos mesmos. Os resultados de medida de diâmetro e de intensidade de cor por área foram expressos em porcentagem de inibição (%). O cálculo baseou-se na diminuição da área do halo sem coloração avermelhada formado ao redor dos poços quando comparadas as amostras que continham extrato proteico e as que continham o extrato proteico fervido. A medição foi feita por meio de captura da imagem em câmera fotográfica e cálculo de dimensões a partir do software Quantity One (Bio-Rad).

3.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos seguiram um delineamento inteiramente casualizado e as análises estatísticas foram feitas a partir do programa Assistat 7.6 beta (2011). O erro padrão foi avaliado pelo teste de Tukey, considerando estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,01$. Para as análises que contemplaram a comparação estatística da expressão gênica ao longo do desenvolvimento dos frutos foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DA RESPIRAÇÃO, PRODUÇÃO DE ETILENO E FIRMEZA DA POLPA

Nas análises físico-químicas, os parâmetros analisados permitiram definir o estágio de amadurecimento dos dois lotes de frutos amostrados, indicando o grau de homogeneidade entre os experimentos. Foram avaliadas a taxa respiratória, o nível liberado de etileno e a velocidade e intensidade de perda de firmeza da polpa. Os frutos foram analisados durante todo seu período de pós-colheita. Os resultados das análises das duas amostragens estão apresentados na Figura 3.

Observa-se na Figura 3 (A) que a liberação de etileno foi máxima aos 6 DPC, tanto para a amostragem 1 quanto para a amostragem 2, sobressaindo-se nesta segunda, onde o pico de liberação de etileno foi um pouco maior que o apresentado na primeira amostragem. A liberação de etileno foi crescente até os 6 DPC, ponto indicativo do climatério dos mamões, diminuindo a partir daí e apresentando uma fase discreta de oscilação dos níveis do hormônio, sendo os valores ainda elevados em relação aos primeiros dias de análise.

Para as taxas de CO₂ liberado, apresentadas na figura 3B, observa-se que a segunda amostragem também apresentou um perfil semelhante à primeira. A discreta diminuição das taxas de CO₂ nos primeiros dias de análise (1 DPC e 2 DPC) foi seguida de um aumento mais pronunciado a partir dos 4 DPC caracterizando o pico respiratório dos frutos. Nesse caso é possível considerar que a taxa respiratória respondeu prontamente ao incremento nos níveis de etileno, mesmo antes de ser alcançado o pico desse hormônio. A variação observada na respiração coincidiu com a progressiva perda da firmeza da polpa, que foi mais expressiva após os 3 DPC.

Figura 3. Parâmetros físico-químicos de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) das amostragens durante o amadurecimento. (A) Etileno produzido pelos frutos, medido por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (etileno $\mu\text{L Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$); (B) CO_2 produzido pelos frutos, medido por cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica (CO_2 $\text{mL Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$); (C) Firmeza da polpa, medida com penetrômetro, e expressa como força necessária para a penetração da ponteira do equipamento no tecido vegetal (N). As barras verticais representam o erro padrão ($n=4$).

A firmeza da polpa (Figura 3C) apresentou o resultado esperado na fase pós-colheita, decrescendo com o passar dos dias. Para os frutos da segunda amostragem, a firmeza da polpa apresentou-se tão elevada quanto a dos frutos da primeira amostragem logo nos primeiros dias de análise. No terceiro dia pós-colheita os valores apresentaram-se semelhantes e a partir daí, para ambas as amostragens, foi o momento crítico da perda de firmeza (entre os 3DPC e os 5 DPC), com queda mais acentuada da firmeza aos 4 DPC da amostragem 2, sendo que a partir desse dia os valores foram estatisticamente semelhantes, e demonstraram que os frutos tiveram o mesmo padrão de amaciamento. Tipicamente, em ambas as amostragens, após o nono dia de análise os frutos já apresentaram sinais discretos de podridão peduncular, depreciando sua qualidade e tornando-os impróprios para consumo. Uma vez que a podridão poderia ser um fator relevante a afetar os resultados, como os de liberação de etileno, foram considerados apenas os frutos amostrados até o nono dia após a colheita.

De maneira geral, as medições diárias permitiram a caracterização fisiológica dos dois lotes de frutos (amostragens 1 e 2). Os resultados permitiram conhecer não só o perfil de amadurecimento das duas amostragens, que foram feitas em uma mesma época de anos consecutivos, mas permitiram obter o material vegetal correspondente a duas replicatas verdadeiras, possibilitando estimar o grau de variabilidade biológica e seu reflexo na expressão gênica. Os resultados de liberação de etileno, padrão respiratório e perda de firmeza da polpa indicaram uma boa homogeneidade de ambas as amostragens e por não apresentarem resultados discrepantes ao ponto de gerarem grandes diferenças estatísticas, conclui-se que os frutos apresentavam-se no mesmo estágio de maturação quando colhidos.

4.2 SELEÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CANDIDATAS

A busca de sequências codificadoras de proteínas com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas (PGIPs) no genoma do mamoeiro foi feita com base na similaridade frente àquelas de outros vegetais já descritas no banco de dados. Uma vez que a conservação das PGIPs entre diferentes vegetais já é bastante citada na literatura, a prospecção voltou-se principalmente para o uso das

PGIPs de espécies frutíferas como referência. Com relação ao mamoeiro, até o momento dessas análises as informações a respeito de possíveis PGIPs estavam limitadas a uma única sequência codificadora parcial (gb|AY673961.1|), descrita em 2004 e sobre a qual até o presente não foi divulgada nenhuma caracterização.

A partir dessa triagem inicial baseadas em similaridades com PGIPs de outras espécies foram identificados no genoma do mamoeiro 13 contigs candidatos a englobarem supostos genes de PGIPs. Esses contigs estão listados na tabela 4 e foram submetidos a análises adicionais.

Tabela 4. Lista dos *contigs* do mamão papaia portadores de sequências candidatas a codificarem PGIPs. As duas últimas sequências apresentadas (LG4_15848 e LG6_5084) foram as escolhidas para as análises.

Posição inicial	Contig	Número de acesso	Tamanho da sequência (pb)	Número de repetições do consenso para PGIPs *	Presença de íntrons
43627	LG8_17758	ABIM01017733	1357	11	Não
13884	LG6_15761	ABIM01015741	326	0	Sim
4776	LG3_15963	ABIM01015941	569	0	Sim
12654	LG9_5877	ABIM01005870	860	9	Não
3833	Un Contig_25824	ABIM01025787	632	10	Sim
11066	LG4_2304	ABIM01002304	640	2	Sim
3123	LG9_5861	ABIM01005854	221	10	Não
2463	LG9_5813	ABIM01005806	508	8	Não
8631	LG8_27606	ABIM01027568	1025	8	Não
32277	LG9_18185	ABIM01018160	862	5	Sim
21200	LG1_6264	ABIM01006256	499	0	Sim
15213	LG4_15848	ABIM01015828	980	10	Não
10769	LG6_5084	ABIM01005077	979	10	Não

* O consenso geralmente encontrado em PGIPs é: LxxLxxLxxLxLxxNxLxGxIPxx (De LORENZO et al., 1994).

Esses 13 *contigs* do genoma do mamoeiro foram inicialmente selecionados por apresentarem similaridade com ao menos um dos acessos de PGIPs já descritos para outras frutas. Todos os fragmentos inseridos nos contigs do mamoeiro foram alinhados isoladamente com os genes de PGIPs das outras frutas através do programa CLUSTALW, tanto para a sequência nucleotídica quanto para a sequência proteica traduzida por meio da ferramenta BCM Search Launcher. Posteriormente, as sequências nucleotídicas das prováveis PGIPs do mamoeiro foram traduzidas e as sequências de aminoácidos foram utilizadas para a busca de proteínas presentes no banco de dados com o auxílio da ferramenta tBlastn.

Apesar de uma parte do genoma do mamoeiro não estar disponível no GenBank, os segmentos selecionados dentre os cerca de 92% já sequenciados foram analisados para a identificação de prováveis regiões codificadoras (ORFs), presença de íntrons e posição destes. Posteriormente, foram avaliados na sequência, o número de pares de bases, o tamanho da provável sequência peptídica correspondente, a ocorrência de regiões de consenso geralmente encontradas em PGIPs (LxxLxxLxxLxLxxNxLxGxIPxx) (De LORENZO et al., 1994) e o número de repetições desses consensos, ser de 8 a 10 repetições. De acordo com a literatura, os genes de PGIPs são caracterizados pela presença dessas regiões ricas em leucina, constituindo motivos do tipo “Leucine Rich Repeats” (LRR), sendo marcados por cerca de 10 motivos deste tipo, além de não serem interrompidos por íntrons, em sua maioria, e codificarem peptídeos contendo entre 300 e 330 aminoácidos.

Do levantamento inicial dos 13 contigs e após a aplicação de todos os critérios de seleção e análises *in silico* mencionadas acima, com sucessivas análises via BLAST e comparações individuais e coletivas, foram adotadas duas sequências que preencheram todos os requisitos estabelecidos: LG4 contig_15848 e LG6 contig_5084 (Tabela 4). Essas duas sequências foram então denominadas *Cppgip4* (*Carica papaya* polygalacturonase-inhibitor protein) e *Cppgip6*, por estarem localizadas no grupo de ligação (Linkage Group; LG) 4 e no grupo de ligação 6, de acordo com sua identificação no banco de dados. Os grupos de ligação indicam grupos de genes que tendem a ser transmitidos em conjunto, ou seja, podem ser denominados genes ligados.

O fragmento de DNA de *Cppgip4* apresentou um tamanho de 980 pb, enquanto para *Cppgip6* foi de 979 pb. Ambos os fragmentos foram alinhados para comparação entre si, sendo essa análise apresentada na Figura 4.

De acordo com a figura, pode-se observar-se que os dois fragmentos apresentam alta similaridade, sugerindo grande conservação entre as sequências descritas para o mamoeiro.

Figura 4. Alinhamento entre as sequências nucleotídicas dos dois fragmentos de prováveis genes de PGIPs de mamoeiro (*Cppgip4* e *Cppgip6*). Os números à direita indicam o total de nucleotídeos apresentados em cada linha. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos nas duas sequências. A seta indica o sítio de clivagem do peptídeo sinal. Os nucleotídeos sublinhados indicam as sequências dos iniciadores senso e antisense utilizados para amplificação e clonagem.

Esse alinhamento dos genes do mamoeiro foi marcado por uma porcentagem de identidade ao redor de 70% frente às diferentes PGIPs. O resultado dessa análise também forneceu um “Score” que esteve na casa dos 526 bits e um E-value de $4e^{-153}$, indicando um alto grau de similaridade entre as sequências analisadas, a partir do primeiro parâmetro, e um alto grau de especificidade, uma vez que o segundo valor apontou a probabilidade de alinhamento aleatório.

Após todas essas etapas de análises das sequências de nucleotídeos de *Cppgip4* e *Cppgip6*, estas foram traduzidas nas respectivas sequências de aminoácidos e foi realizado um alinhamento múltiplo via ClustalW, empregando as sequências de aminoácidos de PGIPs dos vegetais utilizados como referências de busca no genoma do mamoeiro, de modo a verificar o quanto as sequências de PGIP desse vegetal são conservadas em relação às demais. Apesar de existirem outras sequências de PGIP de frutos no banco de dados, algumas delas apresentaram similaridade apenas com as sequências que não foram selecionadas e, portanto, não foram avaliadas quando procedeu-se o alinhamento múltiplo das candidatas com as referências.

A partir das comparações entre as sequências deduzidas de aminoácidos foi gerado um alinhamento, mostrado na figura 5, comparando as sequências de PGIPs do mamoeiro com as de outros frutos. Como pode ser notado em ambas as sequências de aminoácidos das prováveis PGIPs de mamoeiro ocorrem regiões bastante conservadas nas quais se observam motivos característicos de LRRs, representados pela presença abundante do resíduo de leucina. O alinhamento indica que tanto CPPGIP4 quanto CPPGIP6 são bastante similares às PGIPs de outras frutas, confirmando a observação feita inicialmente também para os nucleotídeos. Este grau de alinhamento e similaridade ratificou a escolha dessas duas sequências como prováveis PGIPs do mamoeiro e, portanto, foram utilizadas nas etapas seguintes do projeto.

A análise do alinhamento indica algumas diferenças pontuais entre as sequências de CpPGIP e entre estas e as sequências de outros frutos. Como já foi reportado na literatura, mutações em determinados aminoácidos, principalmente aqueles localizados dentro de regiões consenso de PGIPs podem revelar diferenças na especificidade de uma determinada proteína. Alguns resíduos podem ser específicos para determinadas funções proteicas, como é o caso do resíduo 224 de glicina, que foi descrito por Di Matteo et al. (2003) no feijão, e que é responsável pelo reconhecimento de *Fusarium moniliforme* quando há o contato deste com a parede celular do vegetal.

No caso das PGIPs do mamoeiro, observa-se uma diferenciação entre os resíduos de aminoácidos 243 e 247 marcados na figura 5. Essa diferença é observada não apenas entre esses dois genes mas também em relação à maioria das outras sequências alinhadas. Observa-se que o resíduo Leu-247 de CpPGIP6 coincide com o de outras sequências gênicas do alinhamento e estas, por sua vez, diferenciam-se de CpPGIP4, pois para esta última proteína há um resíduo de serina na posição 243. Já foi observado por Leckie et al. (1999) que mutações relacionadas ao aminoácido glutamina, principalmente dentro de sequências LRR, como é o caso da posição Gln-253 de uma das isoformas de PGIP do feijoeiro (pgip-1), são responsáveis pela mudança no padrão e especificidade do reconhecimento de espécies fitopatogênicas. Este mesmo autor indicou que substituições não-sinônimas na região “folha-beta” da proteína, como é o caso das mutações ocorridas para CpPGIP, são responsáveis pelo reconhecimento específico de ligantes nessa região proteica.

Outra análise realizada foi a de modelagem da estrutura das proteínas de CpPGIP4 e CpPGIP6 a partir da homologia com o banco de dados. Esse resultado pode ser observado na figura 6.

Figura 6. Representação esquemática do modelo tridimensional de *Cppgip4* (A) e *Cppgip6* (B) preditos a partir da estrutura de PGIP de *Phaseolus vulgaris* (PvPGIP2) presente no banco de dados utilizando o servidor SWISS-MODEL.

As estruturas cristalinas de CPGIP4 e CPPGIP6 são bastante similares e foram construídas a partir do modelo disponível no servidor Swiss-Model que trata da estrutura de uma PGIP de *Phaseolus vulgaris* (PvPGIP2) que apresenta uma estrutura típica de LRRs com uma cadeia helicoidal. A parte interna, côncava, é formada por estruturas de β -folha seguidas por cadeias de α -hélice, caracterizando domínios típicos de proteínas do grupo das LRRs e é composta pelos resíduos que determinam a atividade e a especificidade da proteína (SICILIA et al., 2005). Esta região é responsável pela interação das PGs com a parede celular, tanto por inibição das interações necessárias para a ligação, quanto por obstrução do sítio ativo da enzima, caracterizando um modo de inibição competitiva (FEDERICI et al., 2001).

Outra característica estrutural importante das PGIPs do mamoeiro, diz respeito à presença de um peptídeo sinal na estrutura proteica. Essas sequências de aminoácidos sinalizam e direcionam a proteína para que a mesma seja exportada via canais proteicos até o seu local de destino e podem, além disso, contribuir para confirmar a identidade da proteína avaliada com base na comparação com os bancos de dados de predição de sítios de clivagem de peptídeo sinal e também de predição de sub-localização celular. A Figura 7 indica os prováveis sítios de clivagem do peptídeo sinal em CpPGIP4 e CpPGIP6 preditos a partir do servidor SignalP.

Figura 7. Representação gráfica da detecção do peptídeo sinal de CpPGIP4 (A) e CpPGIP6 (B) preditos pelo software SignalP a partir da sequência de aminoácidos que codificam os referidos polipeptídeos.

A análise dos peptídeos sinal revelou a presença de um provável sítio de clivagem entre os aminoácidos 19 e 20 para CpPGIP4 e entre o aminoácido 23 e o 24 para CpPGIP6, o que indica a ocorrência de exportação dessas proteínas, característica esperada para as PGIPs do mamoeiro, como ocorre em outras PGIPs. A informação de que estas proteínas são provavelmente exportadas via secreção convencional para outro compartimento celular é um dado que fortalece a hipótese da identidade dessas sequências como sendo de PGIPs. Dessa forma, para testar se essas proteínas poderiam ser transportadas para a parede celular, ou mesmo outro compartimento celular, as sequências foram analisadas com o software WOLFP SORT, que busca prováveis sublocalizações celulares proteicas. O resultado dessa análise está representado na tabela 5.

Tabela 5. Predição da sublocalização celular de CpPGIP4 e CpPGIP6 de acordo com o predito pelo servidor WOLFP SORT.

proteína	identidade	Proteína de identidade	Localização subcelular
CpPGIP4	60%	PGIP de <i>Pyrus communis</i>	Apoplasto e parede celular
CpPGIP6	66%	PGIP de <i>Pyrus communis</i>	Apoplasto e parede celular

A análise trouxe como resultado uma identidade de 60 e 66% entre as sequências de aminoácidos de PGIPs de outros frutos com as de CpPGIP4 e CpPGIP6, respectivamente. Esse padrão de identidade demonstra que, assim como em *Pyrus communis*, no mamoeiro as sequências descritas como PGIPs estão

provavelmente localizadas no apoplasto e na parede celular, fato que foi também identificado por outros autores quando analisaram as PGIPs de pera (STOTZ et al., 1993), do trigo (JANNI et al., 2008), da soja (D'OVIDIO et al., 2006) e do tomate (POWELL et al., 2000).

Após a confirmação desses resultados *in silico* foram definidas as sequências de iniciadores para a amplificação das sequências das prováveis PGIPs de mamoeiro a partir do DNA genômico e do cDNA. Com base nas sequências de *Cppgip4* e *Cppgip6*, foi utilizado o programa Primer3 para predizer inicialmente as possíveis combinações de iniciadores mais eficientes para a amplificação dos fragmentos contendo as prováveis regiões codificadoras completas, com base nos alinhamentos entre as sequências deduzidas. Dessa forma, foram buscados os iniciadores que pareassem na ORF dirigindo a amplificação da provável região codificadora e não aqueles que antecedem ou precedem os prováveis limites da mesma, uma vez que não se tem conhecimento preciso a respeito do início ou do fim da transcrição desses genes do mamoeiro.

4.3 CLONAGEM DOS cDNAs DE PGIPs DE MAMÃO

Como avaliação preliminar da adequação dos pares de iniciadores para a amplificação das duas sequências candidatas (*Cppgip4* e *Cppgip6*) utilizou-se primeiramente o DNA genômico como molde. As sequências resultantes da clonagem e do sequenciamento do DNA genômico apresentaram total identidade com as sequências previstas para *Cppgip4* e *Cppgip6* e sem a interrupção de íntrons. Da mesma forma que para a amplificação dos fragmentos a partir do cDNA, os fragmentos obtidos a partir do DNA genômico apresentaram fragmentos com um tamanho de 980 pb *Cppgip4*, enquanto para *Cppgip6* foi de 979 pb indicando a inexistência de íntrons interrompendo a sequência.

Para a amplificação e a clonagem a partir do cDNA, utilizou-se a técnica de transcrição reversa do RNA mensageiro. O resultado da extração de RNA está representado na figura 8. A extração de RNA a partir dos tecidos da planta e dos frutos permitiu um rendimento satisfatório, variando conforme o tipo de tecido (84 a 700 ng de RNA por mg de tecido), sendo que as folhas tiveram um rendimento maior e o caule apresentou um rendimento menor.

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA total extraídos das polpas de mamões amostrados durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA) (A); durante os 9 dias pós-colheita (DPC) (B); e das raízes (1 e 2), caule (3 e 4), folhas (5 e 6) de plantas de mamoeiro amostradas ao 3 meses (1, 3 e 5) e aos 6 meses de idade (2, 4 e 6) e também de sementes de frutos amostrados durante o desenvolvimento aos 90 DPA (7), e na fase de pós-colheita aos 2 DPC (8) (C), revelados com coloração com ‘SYBR Safe DNA Gel Stain’ da Invitrogen na diluição 1:10.000 (v/v) e visualizados sob luz ultravioleta. Ao lado direito estão indicadas as posições das bandas dos RNA ribossomais.

Apesar das diferenças de rendimento entre os diferentes tecidos, as extrações resultaram em um material de boa qualidade que permitiu as reações de síntese de cDNA. Para todas as extrações do RNA as bandas apresentaram-se bem definidas, indicando integridade e pureza adequadas, verificadas a partir da integridade no gel e razão de absorbância em 260 nm e 280 nm.

Os resultados das amplificações dos cDNAs com os iniciadores específicos para as PGIPs do mamoeiro são apresentados na Figura 9. Os resultados das PCR revelaram a amplificação satisfatória dos cDNAs de ambos os genes, com a presença dos fragmentos no tamanho esperado (978 pb).

Esses fragmentos foram utilizados para a clonagem e a presença dos insertos foi confirmada tanto por meio de um “PCR colony” para os transformantes quanto pela posterior digestão dos plasmídeos purificados com as enzimas KpnI e Apal, que clivam regiões específicas do vetor para a liberação dos insertos derivados de *Cppgip4* e *Cppgip6*.

O sequenciamento foi feito a partir de clones de cDNA derivados de frutos colhidos aos 90 DPA, representativo de material vegetal em desenvolvimento, e de frutos que se encontravam aos 3 DPC e 8 DPC na fase de amadurecimento.

Figura 9. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos da PCR aos 60 e 90 DPA e do 1 DPC ao 9 DPC para *Cppgip4* – (A) e *Cppgip6* – (B). Os fragmentos obtidos foram visualizados por coloração com ‘SYBR Safe’. Os números da esquerda referem-se aos tamanhos (pb) dos amplicons obtidos. Nas colunas à esquerda dos géis, indicadas por M, foram aplicadas alíquotas do padrão do tamanho de DNA.

Optou-se pelo uso de amostras nesses três pontos distintos (90 DPA, 3 DPC e 8 DPC) para que se confirmasse a presença dos mesmos produtos dos genes ao longo de todo o desenvolvimento do fruto.

Os resultados dos sequenciamentos, a partir dos clones derivados dos RNA dos frutos dessas três amostras, foram analisados conjuntamente para a determinação das sequências de consenso. Para cada produto de amplificação do cDNA, se de *Cppgip4* ou *Cppgip6*, apenas uma única sequência foi obtida nos três diferentes pontos amostrais analisados. As sequências de consenso para os cDNAs do *Cppgip4* e *Cppgip6*, estão apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente, que mostram também as sequências de aminoácidos deduzidas a partir dos cDNAs.

```

>CpPGIP4 frame +1
DNA: ATGAAAGCCCTTCTCCACTTCATCGTCGGTTTCCTCATCCTCTCTCCTTCC 51
+1: M K A L L H F I V G F L I L S P S

DNA: CTCGGCGAGCTCTGCAACACAGAAGACAAAAAAGTCCTCCTCAAGATCAAG 102
+1: L G E L C N T E D K K V L L K I K

DNA: AAAGCCCTACACAACCCTTACCACCTTGTCTCATGGGATCCTAAAACAGAC 153
+1: K A L H N P Y H L V S W D P K T D

DNA: TGCTGTACCTGGTACTGCGTCCATTGTCATGACACCACCCACCGGATCGAC 204
+1: C C T W Y C V H C H D T T H R I D

DNA: CAGCTAAATATATTCTCCGGCGATATCAACGGCCAAATCCCGCCGGAAGTC 255
+1: Q L N I F S G D I N G Q I P P E V

DNA: GGTGACCTTCCCTTCCTCGATTATCTAGTCTTCCGCAAACCTCACAAACCTC 306
+1: G D L P F L D Y L V F R K L T N L

DNA: ACCGGCACTATACCACCCACCATAGCCAAACTCAAGAACCTCGTCTCCCTC 357
+1: T G T I P P T I A K L K N L V S L

DNA: ACCCTCAGCTGGACAGACCTCTCTGGCCCAGTTCAGGCTTTCTCAGCCAG 408
+1: T L S W T D L S G P V P G F L S Q

DNA: CTCAAGAACCTAGACTACTTGGATCTTTCCTTTAACAAACTCTCCGGCACC 459
+1: L K N L D Y L D L S F N K L S G T

DNA: ATACCTAGCTCCTTCTCTTCCCTTCCCCAAGCTTCGCACTCTTCACTTGGAC 510
+1: I P S S F S S F P K L R T L H L D

DNA: AGAAACAAGCTTACCGGGTCGATACCGGAGTCTTTCGGATCCTTTTCGCGGG 561
+1: R N K L T G S I P E S F G S F R G

DNA: GAAGTACCCGACTTGTTCCTTGTCCACAAACCAGCTCGCTGGTAAGCTTCCA 612
+1: E V P D L F L S H N Q L A G K L P

DNA: GTCTCGCTAGGGAAAATGCAGTTTAGAACTATTGATTTGTCGTGGAACAGG 663
+1: V S L G K M Q F R T I D L S W N R

DNA: CTTCAGGGTGACGCGTCCATGTTGTTTAAACACGCAAACCATGGTGATTATT 714
+1: L Q G D A S M L F N T Q T M V I I

DNA: CTGTGCGAGGAACCTTTTTGAGTTTGATCTTTCGAAAGTGAAGTTACCCAGA 765
+1: L S R N S F E F D L S K V K L P R

DNA: AGCTTGGTGTGGCTGGATCTGAGCCACAACAGAATCAGAGGTAGCTTACCG 816
+1: S L V W L D L S H N R I R G S L P

DNA: GCAGGGTTGGCCCGGCTTCAGTTGCAGTTCCTGAACGTAAGCTATAACTTT 867
+1: A G L A R L Q L Q F L N V S Y N F

DNA: CTGTGTGGGAAGATCCCGGACGGCGAAGAGCTGGGGAGGTTTCGATTTCGTCG 918
+1: L C G K I P D G E E L G R F D S S

DNA: TCTTACTTTTCATAACCGGTGCCTGTGCGGTGCCCTTCTGCAACCATGCAAG 969
+1: S Y F H N R C L C G A P L Q P C K

DNA: CTGAAGTAA 978
+1: L K *

```

Figura 10. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do consenso do produto da amplificação de *Cppgip4* a partir dos cDNAs dos frutos aos 90 DPA, 3 DPC e 8 DPC com os iniciadores *Cppgip4* senso e *Cppgip4* antisense. A sequência deduzida de aminoácidos está apresentada na linha inferior, a partir do quadro de leitura (frame) +1. As letras representam o código IUB/IUPAC para aminoácidos. Os números à direita de cada linha indicam os nucleotídeos contados na respectiva linha. O asterisco representa o códon de terminação. Os nucleotídeos delimitados pelos retângulos indicam os iniciadores utilizados para amplificação dos genes.

```

>CpPGIP6 frame +1
DNA: ATGGAACCCCTTCAAAAATTTTCCTTCTCTGATCATCATCTTCTTCGCCATC 51
+1: M E P L Q K F S F L I I I F F A I

DNA: CTCTCTCCATCTTTCTCAGACCGCTGCAACCCAGAAGACAAAAAAGTTCTC 102
+1: L S P S F S D R C N P E D K K V L

DNA: CTCAAGATAAAAAAAGCACTACACAATCCTTACCACCTTGCCTCATGGAAC 153
+1: L K I K K A L H N P Y H L A S W N

DNA: CCAGAAGTCGACTGCTGCATATGGTACTCACTCAAATGCAGCCGCACCACC 204
+1: P E V D C C I W Y S L K C S R T T

DNA: AACCGAGTATATAAACTCACCATCTTTCGCCGGCCAGATCAACGGTCAAATC 255
+1: N R V Y K L T I F A G Q I N G Q I

DNA: CCGGCCGAAGTCGGCGACCTTCCCTTCCTCGAAACCCTAATGTTCCACAAA 306
+1: P A E V G D L P F L E T L M F H K

DNA: CTAACCAACATCACTGGCCCCAGTCCAACCCGCCATTGCCAAACTCACCAAC 357
+1: L T N I T G P V Q P A I A K L T N

DNA: CTCAAGTACCTTGATCTTAGCTGGAATCATCTCTCCGGCCCAGTTCCTCGAC 408
+1: L K Y L D L S W N H L S G P V P D

DNA: TTTCTCAGCCAGCTCAAGAACCTAATCTTCTTGGATCTTTTCAATTAATCAA 459
+1: F L S Q L K N L I F L D L S F N Q

DNA: CTCTCTGGGTCTATCCCAAGCTCGCTCTCCACCCTTCCAAACCTTACATCC 510
+1: L S G S I P S S L S T L P N L T S

DNA: ATCCGCCTGGACAGAAACAATCTCACCGGTCAAATACCGATGTCCTTCGGT 561
+1: I R L D R N N L T G Q I P M S F G

DNA: TCCTTCGCCGGAGAATTTCCATACTTAATCCTGTCTCACAACAAGCTTTCC 612
+1: S F A G E F P Y L I L S H N K L S

DNA: GGCAGCATACCGGCATCATTGGGTAAAAAGGACTTCGGCAACCTTGATTTG 663
+1: G S I P A S L G K K D F G N L D L

DNA: TCGAGGAACAGGCTCGAAGGCGATGCGTCGATGGTGTTCAACTCCAAAACC 714
+1: S R N R L E G D A S M V F N S K T

DNA: AGGTGGATTGATCTGTGCGAGGAACCTTATTGGAGTTTGATTTTTTCGAAAGTG 765
+1: R W I D L S R N L L E F D F S K V

DNA: GAGTTGTCTGGAGAACTTAACATGGTTGGATCTGAACCATAACAAGATTACA 816
+1: E L S E N L T W L D L N H N K I T

DNA: GGGAGTCTGCCGGAGTCAGCGATTGTAAGCTTGCAGTTCTTGAATGTGAGC 867
+1: G S L P E S A I V S L Q F L N V S

DNA: TACAACAGACTGTGTGGAGAGATCCAGTCGGCGGCGATTTACAGAGGTTTC 918
+1: Y N R L C G E I P V G G D L Q R F

DNA: GATTACACTGCGTATTTTCACAATCGGTGCTTGTGCGGTGCTCCTCTTCCG 969
+1: D Y T A Y F H N R C L C G A P L P

DNA: CCCTGCAAG 978
+1: P C K

```

Figura 11. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do consenso do produto da amplificação de *CpPgip6* a partir dos cDNAs dos frutos aos 90 DPA, 3 DPC e 8 DPC com os iniciadores *CpPgip6* senso e *CpPgip6* antisense. A sequência deduzida de aminoácidos está apresentada na linha inferior, a partir do quadro de leitura (frame) +1. As letras representam o código IUB/IUPAC para aminoácidos. Os números à direita de cada linha indicam os nucleotídeos contados na respectiva linha. Os nucleotídeos delimitados pelos retângulos indicam os iniciadores utilizados para amplificação dos genes.

Como esperado, as sequências obtidas dos cDNAs dos frutos apresentaram identidade com os contigs de *Carica papaya* tomados como base para a definição dos iniciadores, confirmando assim a correta amplificação das sequências codificadoras de *Cppgip4* e *Cppgip6*.

De posse dos resultados confirmatórios de todas as amplificações, tanto as sequências descritas para o DNA genômico quanto as descritas para o cDNA foram depositadas no GenBank®, sob os códigos de submissão JQ308344 (*Cppgip4*) e JQ308345 (*Cppgip6*), para as sequências identificadas a partir do DNA genômico e HQ724529 (*Cppgip4*) e HQ724530 (*Cppgip6*) para as sequências identificadas a partir do cDNA.

Ambas resultaram em um Score de 1807 e um E-value de 0.0, sendo idênticas às sequências de origem presentes nos contigs e àquelas clonadas a partir do DNA genômico. Após a confirmação da amplificação correta dos fragmentos, estes resultados foram depositados no GenBank® sob os códigos de acesso: HQ724529 (*Cppgip4*) e HQ724530 (*Cppgip6*).

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA (qPCR)

4.4.1 Análise da expressão gênica na casca e na polpa

Após os resultados da clonagem e identificação das sequências, procedeu-se então a análise da expressão dos genes por PCR quantitativa (qPCR). A Figura 12 apresenta a eficiência da amplificação com Platinum® SYBR® Green para as PGIPs na casca e na polpa e para os genes de referência (β -actina, TEF e UBQ).

Para todas as curvas de regressão analisadas, os valores de eficiência de amplificação foram muito semelhantes e mostraram boa linearidade, tanto para os genes de referência quanto para os genes de PGIP.

Em termos de eficiência da reação, *Cppgip4* apresentou o valor de 2,15, enquanto para *Cppgip6* foi de 1,99 e para β -actina foi de 2,03, para TEF 1,88 e UBQ chegou a 1,89, valores que possibilitam para uma eficiência ótima de reação, que segundo Schmittgen e Livak (2008) devem variar de 1,8 a 2,2 quando é utilizado o método de Ct comparativo.

Figura 12. Análise de regressão da relação entre o ciclo limiar (Ct) e o log da quantidade de RNA (ng) referente às curvas padrão de eficiência da reação para os genes de referência (β -actina, fator de elongação-TEF e ubiquitina-UBQ) e para *Cppgip4* e *Cppgip6* a partir de diluições seriadas dos cDNAs da polpa e da casca. β -actina (ACT), ubiquitina (UBQ), fator de elongação (TEF), *Cppgip4* (Ct4) e *Cppgip6* (Ct6). Cada valor de Ct corresponde à média de uma quadruplicata técnica.

Para os genes avaliados, o valor de Ct decresceu linearmente com o aumento da quantidade de amostra ao longo da escala logarítmica (inclinação da reta variando de -2,99 a -3,71). Observa-se também que os pontos referentes ao logaritmo da quantidade de RNA foram diferentes entre os genes analisados uma vez que os mesmos apresentaram, em testes preliminares, diferenças em termos de expressão entre as diferentes diluições do RNA, sendo adotados então diferentes valores de diluição para obtenção de seus perfis de amplificação. A qualidade das reações também pode ser confirmada pela análise dos coeficientes de correlação (R^2) que variaram de 0,9731 a 0,9947 ($p < 0,001$).

Com base nos resultados das curvas de eficiência das reações, o padrão de expressão dos dois genes de PGIP de mamoeiro foi determinado a partir das análises de qPCR, tendo como genes de referência a β -actina (ACT), a ubiquitina (UBQ) e o fator de elongação (TEF), a partir das duas amostragens de frutos que compuseram a duplicata biológica do experimento. O uso de mais de um gene de referência para a análise da expressão relativa indica a necessidade de se confirmar os resultados de acordo com as condições experimentais individuais. Genes que são encontrados no metabolismo básico do vegetal e na manutenção da estrutura celular

(BASTOLLA, 2007), como a β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), subunidades ribossomais, e que são comumente utilizados para estas análises, geralmente não apresentam padrão invariável de expressão, e geralmente dependem muito especificamente das condições de análise das amostras e do quão variados são os tratamentos aplicados.

Os dados brutos do Ct (ciclo limiar) foram avaliados e a eficiência de cada iniciador foi utilizada para o cálculo do quanto este parâmetro oscila em relação às diferentes amostragens ou tecidos. Essas variações entre as condições experimentais podem ser mais sutis como as observadas no gene do fator de alongação, TEF, ou mais pronunciadas como é o caso da β -actina. A partir desses resultados nota-se que as variações do gene de referência interna oscilam dependendo das condições às quais as amostras são submetidas ou variam de acordo com o tecido ou época de amostragem.

Resultados que apresentaram uma variação estatística importante foram observados para todos os genes avaliados e indicaram que a análise simples da variação do Ct ao longo das condições experimentais não respondem efetivamente acerca da qualidade e da utilidade destes genes para os cálculos. Dessa maneira, faz-se necessária uma análise mais criteriosa da relação entre a expressão desses genes e sua variação ao longo das condições experimentais. Para isso, outras ferramentas são utilizadas para que se possa determinar com acurácia qual é o gene normalizador mais apropriado para o cálculo da expressão relativa. Dessa forma são utilizadas ferramentas como os programas Bestkeeper (PFAFFL et al., 2004); Normfinder (ANDERSEN et al., 2004); Genorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e também o método do Δ Ct comparativo dos genes (Silver et al., 2006). Todos esses métodos estão integrados em um mesmo programa, o RefFinder, que calcula com base nos valores de Ct qual o gene mais estável dentro da condição da amostragem. Essa análise foi efetuada com os dados obtidos para os genes da β -actina, TEF e UBQ e estão apresentados na figura 13.

As análises pelo software RefFinder revelaram o nível de estabilidade dos genes de acordo com quatro métodos diferentes. Para o cálculo dos valores de estabilidade foram utilizados os dados de Ct dos genes quando amplificados a partir dos cDNAs de todos os pontos do desenvolvimento da casca e da polpa nas duas amostragens e refinados de acordo com a confirmação da eficiência medida a partir

de curvas-padrão específicas para cada gene. A média da quadruplicata técnica foi adotada para as análises no software.

(continua)

Figura 13. Valores médios de estabilidade da expressão dos genes de referência β -actina (ACT), Ubiquitina (UBQ) e Fator de alongação (TEF). Valores menores indicam uma maior estabilidade para as amostragens 1 e 2 da casca e da polpa (1-C; 1-P; 2-C; 2-P), analisados pelo programa RefFinder. A estabilidade dos genes foi medida pelo (A) método do ΔC_t , (B) BestKeeper, (C) Normfinder e (D) geNorm.

A aplicação desses métodos foi necessária uma vez que a análise simples de variação do Ct de cada gene não permitiu definir com precisão qual o gene mais apropriado para as análises de expressão relativa. A escolha do gene normalizador correto para cada experimento avaliado é importante principalmente na detecção de pequenas diferenças entre as amostras ou quando a amostragem é muito variada em termos de material utilizado, tratamento ou tecido avaliado, o que reforça a especificidade do uso de controles internos específicos e testados para cada condição de reação (EXPÓSITO-RODRIGUEZ et al., 2011).

Para a análise de estabilidade pelo método do ΔCt (figura 13 A), UBQ e TEF apresentaram-se mais estáveis que a β -actina, e com base na análise mais acurada do software, o gene que codifica TEF e UBQ foram os que melhor atendem às condições de estabilidade do experimento quando comparados com ACT. Este resultado também foi demonstrado para a análise das figuras 13B e 13C.

Além do ΔCt , outra ferramenta de análise de estabilidade, BestKeeper, utiliza apenas a média de todos os valores de Ct, baseando no seu coeficiente de variação e no desvio padrão das médias para a estimativa da estabilidade do gene analisado (Figura 13B). A maior estabilidade de um gene em relação a outro é o resultado de quanto maior for o coeficiente de correlação da média entre o referido gene e os demais. Já a ferramenta NormFinder analisa cada gene candidato de maneira independente e individual (Figura 13 C)

Na figura 13 D, as análises mostram que TEF é o gene mais estável para os cálculos de expressão como normalizador. Nesta análise foi usado o software geNorm que calcula uma medida de estabilidade de expressão, utilizando como princípio que a razão da expressão entre dois genes de referência seja constante em diferentes condições experimentais. Calculados dois a dois, o sistema oferece informações de estabilidade de cada gene em relação a todos os outros candidatos.

Após a análise por todos os métodos apresentados, o *ranking* dos genes avaliados indicou o gene do fator de alongação TEF como o mais estável para os cálculos da expressão relativa, seguido da ubiquitina (UBQ) e por último e menos estável, a β -actina (ACT).

Após a definição do gene de melhor estabilidade para os dados do experimento, a análise dos dados de expressão relativa foi feita com base no cálculo da expressão a partir dos dois melhores genes normalizadores, para a compreensão do padrão de expressão dos resultados com bases de cálculo diferenciadas.

Posteriormente a essa triagem de normalizadores, Zhu et al., (2012) publicaram dados que dizem respeito a uma triagem de 21 genes candidatos a genes de referência para o mamoeiro. Esses dados referem-se as cultivares chinesas 'Shuiyou 29', 'Hongri 19' e 'Hongri 39' e trataram, neste trabalho, tanto da variação e da estabilidade individual dos genes como também na combinação de dois genes que, aplicados ao diversos tratamentos, permitissem a melhor análise de expressão relativa em termos de confiabilidade de resultados. O trabalho abordou, dentre outros, a análise dos três genes utilizados neste trabalho e seu nível de estabilidade frente a diversas condições experimentais condições semelhantes (diferentes tecidos, diferentes estádios de desenvolvimento) e outras mais específicas (tratamento com água quente, diferentes temperaturas de armazenamento). Os autores confirmaram também um resultado encontrado neste trabalho indicando o gene da β -actina como sendo um dos menos estáveis para as análises de qPCR e os genes TEF e UBQ como os que estão entre os mais estáveis para as análises de amadurecimento e de outros tecidos da planta que não os frutos. As análises diferenciais de *Cppgip4* e *Cppgip6* utilizando os dois genes normalizadores geraram os resultados que estão apresentados nas figuras 14 e 15.

Pelos resultados, nota-se que o padrão de variação da expressão dos genes foi semelhante tanto para a amostragem 1 quanto para a amostragem 2, com tendência à diminuição com o decorrer do desenvolvimento dos frutos e independente do gene normalizador analisado (figuras 14 e 15).

A maior diferença encontrada quando comparados os valores de expressão tendo diferentes genes constitutivos como base de cálculo foi a escala de valores que os resultados atingiram. Em ambas as amostragens, para os dois genes e os dois tecidos, foi observado um nível distinto de expressão entre a fase de desenvolvimento e a fase de pós-colheita. Esse resultado, semelhante entre a amostragem 1 e a amostragem 2, e confirmado estatisticamente (Apêndice – Tabela 6), indica um padrão de mudança da expressão consistente e que não foi afetado pela variabilidade biológica do material vegetal em relação a diferentes safras, uma vez que frutos colhidos na mesma época de anos consecutivos mostraram um perfil de resposta muito similar.

Observa-se, por meio da comparação dos valores de expressão relativos ao 1 DPC, que os níveis de expressão dos dois genes, *Cppgip4* e *Cppgip6*, tanto na casca quanto na polpa, em ambas as amostragens analisadas, foram maiores nos

frutos imaturos (até os 110 DPA), com exceção de alguns resultados como os de *Cppgip6* da casca quando utilizado os genes da UBQ e TEF como normalizadores (figuras 14 e 15).

Figura 14. Expressão relativa de *Cppgip4* e *Cppgip6* da polpa e da casca de mamões colhidos durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA), e durante os 9 dias pós-colheita (DPC), em duas amostragens distintas. A amostragem 1 foi realizada em jan/2010 (■) e amostragem 2 em jan/2011 (□). Os dados foram normalizados em relação ao gene da ubiquitina (UBQ), adotado como referência, e expressos considerando o 1 DPC como 1 unidade de expressão gênica. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos do desenvolvimento dentro de uma mesma amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis.

Figura 15. Expressão relativa de *Cppgip4* e *Cppgip6* da polpa e da casca de mamões colhidos durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA), e durante os 9 dias pós-colheita (DPC), em duas amostragens distintas. A amostragem 1 foi realizada em jan/2010 (■) e amostragem 2 em jan/2011 (□). Os dados foram normalizados em relação ao gene do fator de alongação (TEF), adotado como referência, e expressos considerando o 1 DPC como 1 unidade de expressão gênica. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos do desenvolvimento dentro de uma mesma amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis.

Em termos gerais, a expressão dos dois genes na polpa e na casca dos frutos foi relativamente maior dos 30 aos 110 DPA em relação à fase de pós-colheita. Ao longo do amadurecimento dos frutos nota-se que a expressão dos genes foi reduzida mais acentuadamente entre o 1 DPC e o 4 DPC, sendo que a partir daí os valores oscilaram pouco, permanecendo estáveis até a fase de senescência. Esse padrão indica uma tendência à redução na expressão dos genes que, como codificadores de proteínas de defesa, muito provavelmente são requeridos em maior quantidade durante a fase de desenvolvimento dos frutos.

Este resultado concorda com aqueles relatados por outros autores, que demonstram que em outros frutos a expressão de PGIPs também é mais elevada na fase de desenvolvimento, quando estes ainda encontram-se imaturos. Como exemplo desse comportamento pode-se destacar a pera (ABU-GOUKH, STRAND E LABAVITCH, 1983), a maçã (YAO et al., 1999), o tomate (POWELL et al., 2000) e o melão (FISH e DAVIS, 2004) que assim como o mamão, são frutos climatéricos. No entanto, em frutos não-climatéricos também se observa a mesma característica. Em framboesas (WILLIAMSON et al., 1993; RAMANATHAN et al., 1997) e morangos (MEHLI et al., 2004) a expressão de PGIPs também é mais elevada na fase em que os frutos estão imaturos.

Já durante o amadurecimento do fruto, após ser destacado da planta-mãe, a diminuição da expressão e, por conseguinte, a menor atividade das PGIPs, pode funcionar, em alguns frutos, assim como ocorre com outras proteínas de defesa da patogênese presentes no vegetal, como um fator que permite o desenvolvimento da infecção quiescente. Essa facilitação da ação patogênica na fase de amadurecimento pode contribuir positivamente para a liberação das sementes e sua dispersão no ambiente. No momento oportuno, quando o fruto já completou sua etapa de maturação fisiológica, uma diminuição dos níveis de proteínas de proteção pode facilitar o ataque fúngico e, por consequência, um incremento da maceração dos tecidos por ação das enzimas fúngicas e liberação das sementes no ambiente (POWELL et al., 2000).

Quando comparados os níveis de expressão relativa entre os genes, observa-se que a variação da expressão de *Cppgip4* foi maior que a de *Cppgip6*, variando de cerca de 18 vezes na polpa de frutos imaturos em relação ao 1 DPC, enquanto para frutos em estágio avançado de amadurecimento a variação foi de 0,5 vez em relação ao 1 DPC, nos resultados calculados com UBQ e TEF (figuras 14 e 15). Estes

resultados também foram observados para amostras da casca que, apesar de variarem em escala menor, também demonstraram o mesmo perfil, indicando que os genes podem ser modulados com intensidades diferentes, com uma predominância de expressão de uma PGIP em relação à outra, e valores de expressão variáveis em relação ao normalizador utilizado. Em *Cppgip6*, o perfil de variação também foi observado, apresentando um padrão semelhante ao encontrado em *Cppgip4*. No entanto, no caso de *Cppgip6*, a variação da expressão na polpa foi cerca de 4 vezes maior para frutos imaturos quando comparados aos frutos do 1 DPC atingindo um valor de expressão próximo a 0,2 em frutos maduros, quando comparados ao 1 DPC (Figura 14). Tendo UBQ como normalizador, os valores variaram cerca de 3,5 vezes para a polpa de *Cppgip6* e para o fator de alongação (Figura 14) essa variação foi de cerca de 2 vezes para o mesmo gene. Para a casca, os valores de expressão foram cerca de 0,5 vez menor para UBQ e TEF em relação ao 1 DPC em frutos imaturos, e apresentaram um decréscimo de expressão pós-colheita semelhante ao das amostras de polpa.

Essa diferença de expressão entre *Cppgip4* e *Cppgip6* não indica, necessariamente, que *Cppgip4* seja mais abundante e tenha um papel preponderante na defesa contra as PGs fúngicas. Como descrito por Ferrari et al. (2003), membros de uma família de PGIPs com capacidade de reconhecimento específico são regulados de forma diferenciada dependendo do sinal que recebem e da via de transdução do sinal que é ativada. Apesar da diferença entre os dois genes, ela pode ser interpretada como uma peculiaridade do equilíbrio efetivo no controle do ataque fúngico, não somente pela estreita especificidade de cada PGIP, como também por um balanço nos mecanismos de inibição de PGs fúngicas.

Além disso, a presença de múltiplas isoformas de PGIPs pode refletir a necessidade de uma redundância funcional que pode levar a um maior nível de proteção e conferir uma vantagem seletiva (DE LORENZO e FERRARI, 2002). A combinação de *Cppgip4* e *Cppgip6*, mesmo que um se sobressaia ao outro em nível de expressão, pode conferir aos frutos maior cobertura de proteção a um determinado fungo ou a um grupo de fungos causadores de infecções fúngicas típicas de frutos do mamoeiro. A diversidade funcional pode estar relacionada a uma divergência adaptativa e as PGIPs que possuem menor eficiência nas vias de inibição podem ser direcionadas para atuarem em locais específicos da parede

celular onde ocorrem alterações iônicas pontuais durante a resposta de defesa (LECKIE, 1999; NURNBERGER, 2001).

Os resultados mostram grandes diferenças nos níveis de expressão relativa dos genes, no entanto, podem existir diferenças significativas nos valores de expressão absoluta, ou seja, diferenças na quantidade de transcritos entre os genes estudados. Na Figura 16 observa-se o resultado da análise de expressão absoluta indicando o número de transcritos de cada um dos genes por μg de RNA.

Figura 16. Expressão absoluta de *Cpgip4* e *Cpgip6* da polpa e da casca de mamões colhidos durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA), e durante os 9 dias pós-colheita (DPC), em duas amostragens distintas. A amostragem 1 foi realizada em jan/2010 (■) e amostragem 2 em jan/2011 (▒). Os valores foram determinados a partir da curva de calibração com DNA plasmidial. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos do desenvolvimento dentro de uma mesma amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados indicam que os transcritos de *Cppgip6* são mais abundantes do que os de *Cppgip4*, com valores cerca de cem mil vezes maiores para o primeiro. Ao se analisarem a casca e a polpa, observa-se que *Cppgip6* apresentou quantidades muito similares em ambos os tecidos, e também padrão similar de diminuição da expressão absoluta ao longo do amadurecimento. Essa variação foi marcada por uma redução mais sutil dos valores de expressão absoluta, variando de $2,15 \cdot 10^{18}$ a $2,16 \cdot 10^{18}$, não sendo observada mudança mais acentuada na fase de transição da pré-colheita para a pós-colheita, representada pelos pontos a 110 DPA e ao 1 DPC.

A discreta oscilação nos níveis de transcritos na fase de pós-colheita dos frutos, que também pode ser observada quando são comparadas as amostragens 1 e 2, pode ter relação com o que foi citado por alguns autores (SALZMAN et al., 1998; AHARONI et al., 2002), que sugeriram que o estresse relacionado ao amadurecimento é um fator preponderante para um incremento do número de transcritos de genes relacionados à patogênese ao longo do amadurecimento. Pequenas variações no nível dos transcritos podem ser um reflexo de alterações sutis na expressão do gene, como foi sugerido por Ramanathan et al. (1997) em estudos conduzidos em framboesas.

Já para *Cppgip4*, observa-se que na polpa houve uma diferença bastante marcante nos valores de expressão entre a amostragem 1 e a amostragem 2, evidenciada principalmente na fase de pré-colheita, com valores máximos de cerca de $1,5 \cdot 10^{13}$ números de cópias na amostragem 1 e de $6,0 \cdot 10^{12}$ na amostragem 2, enquanto na casca as diferenças entre as amostragens foram muito pequenas e chegando, ambas, a valores máximos de cerca de $4,0 \cdot 10^{12}$ números de cópias, decrescendo de forma bastante similar ao longo do amadurecimento. Estatisticamente, as diferenças entre os pontos do desenvolvimento são apresentados na figura e evidenciam que ocorrem diferenças nos valores de expressão ao longo do desenvolvimento dos frutos. A análise estatística pelo teste de Tukey em termos de diferença entre as amostragens 1 e 2 está apresentada no Apêndice (Tabela 7).

As diferenças mais acentuadas em relação a *Cppgip4* foram observadas quando comparados os níveis de expressão entre polpa e casca, pois essa última teve número de transcritos cerca de dez vezes menor que a polpa durante a fase de pré-colheita, apresentando resultados semelhantes na fase de pós-colheita, na qual os valores são bastante próximos. Além disso, a transição entre as fases de pré e

pós-colheita foi marcada por uma redução bastante acentuada dos níveis de expressão, o que permitiu uma diferenciação bem acentuada entre ambas. Nesse momento, quando o fruto está fisiologicamente maduro, com características físicas indicativas do ponto de colheita, é provável que o sistema metabólico esteja organizado para o início das reações que caracterizam o amadurecimento e a senescência dos frutos e que podem ser cruciais para a regulação da taxa de expressão de muitos genes que, independentemente da relação direta com os processos de infecção, podem se alterar ao longo do desenvolvimento. Resultados semelhantes a esse foram encontrados nas análises de PGIPs em maçãs saudáveis (YAO et al.,1999). As variações dos níveis de transcrição de PGIPs ao longo do desenvolvimento da maçã foram atribuídas à atuação dessas proteínas como reguladoras do crescimento e desenvolvimento do fruto, e não necessariamente a uma resposta ao ataque fúngico.

Os resultados sugerem que a resposta de expressão de *Cppgip4*, relacionada às duas diferentes amostragens, diferentes fases de desenvolvimento e aos diferentes tecidos analisados pode ser mais dependente de alguns fatores intrínsecos e da variabilidade biológica natural decorrente das características da safra em que os frutos foram amostrados, do que necessariamente à infecção fúngica.

Variações temporais e relacionadas a tecidos diferentes sugerem que alguns fatores como o estágio de desenvolvimento do fruto podem estar relacionados à síntese e a atividade das proteínas de defesa contra o ataque patogênico (DE LORENZO, D'OVIDIO e CERVONE, 2001). Dessa forma, a expressão desse gene pode apresentar maior susceptibilidade às condições ambientais, alterando o padrão de expressão no tecido, à fase de desenvolvimento em que ele se encontra, como também em relação ao efeito do destacamento do fruto da planta-mãe, caracterizando assim uma expressão constitutiva desses genes em condições de não-infecção.

4.4.2 Análise da expressão gênica em outros tecidos

Além da análise do padrão de expressão de PGIPs nos frutos do mamoeiro, foi investigada a expressão em outros tecidos da planta, com o objetivo de se

conhecer o padrão de expressão desses genes em outros tecidos da planta e de se identificar os níveis de expressão basal em alguns dos principais tecidos da planta.

A figura 17 apresenta a eficiência da amplificação para as PGIPs e para os genes de referência (β -actina, TEF e UBQ) a partir do *pool* de cDNA de amostras de raízes, caules, folhas e sementes de mamoeiro. Para as curvas de regressão, os valores de eficiência da reação foram de 2,01 para *Cppgip4*, enquanto para *Cppgip6* foi de 2,15, para ACT foi de 1,90, e tanto para TEF quanto para UBQ esse valor foi de 1,89 demonstrando serem muito semelhantes e mostrando boa linearidade, tanto para os genes constitutivos (β -actina, TEF e UBQ) quanto para os genes de PGIP. Como discutido anteriormente, esses valores indicam uma eficiência ótima de reação, uma vez que, segundo Schmittgen e Livak (2008), devem variar de 1,8 a 2,2 quando é utilizado o método de Ct comparativo.

Figura 17. Análise de regressão da relação entre o “Cycle threshold” ou ciclo limiar (Ct) e o log da quantidade de RNA (ng) referente às curvas padrão de eficiência da reação para os genes de referência (ACT; UBQ; TEF) e para os genes de *Cppgip4* (Ct4) e *Cppgip6* (Ct6) construídas a partir de diluições seriadas do *pool* de cDNA de raízes, caules, folhas e semente. Cada valor experimental de Ct corresponde à média de uma quadruplicata técnica.

Da mesma forma, para os cinco genes avaliados houve um decréscimo linear do valor de Ct à medida que a quantidade de amostra foi aumentada (inclinação da reta variando de -2,99 a -3,58). A qualidade das reações também pode ser confirmada pela análise dos coeficientes de correlação (R^2) que variaram de 0,9754 a 0,9968 ($p < 0,001$).

A partir dos resultados das curvas de eficiência foi determinada a expressão absoluta dos dois genes de PGIP a partir de uma amostragem que constou de plantas com duas idades diferentes, ambas representativas da fase vegetativa de desenvolvimento e que compuseram, juntamente com as amostras de sementes de frutos imaturos e fisiologicamente maduros, a duplicata biológica dessa terceira amostragem do projeto. Os resultados permitiram uma comparação temporal e espacial de expressão de *Cppgip4* e *Cppgip6*.

A determinação absoluta do número de cópias permitiu uma comparação direta dos níveis de transcritos dos dois genes, indicando qual o padrão de abundância dos transcritos de cada gene em determinado tecido, além de prover uma estimativa dos níveis gerais de transcritos de PGIP nos diversos tecidos e órgãos da planta. Já é conhecido que o padrão de expressão de PGIPs varia em diferentes partes da planta e em diferentes estádios de desenvolvimento (DEVOTO et al. 1997; MEHLI et al. 2004; ZHANG et al., 2010) e considera-se que a presença de PGIPs em tecidos não-infectados seja parte de um sistema de defesa pré-existente (STOTZ et al., 1993). A partir dos resultados apresentados na figura 18 é possível analisar o perfil de variação da expressão dos genes de PGIP no mamoeiro, considerando não apenas os frutos, mas também folhas, caules, raízes e sementes.

Em uma primeira análise, a PCR quantitativa revelou que o número total de cópias do transcrito por miligrama de tecido apresentou um padrão diferenciado entre *Cppgip4* e *Cppgip6* (Figura 18A). O número de cópias de *Cppgip6* foi relativamente mais alto do que o do gene de *Cppgip4* na maioria dos tecidos avaliados. A prevalência de *Cppgip6* foi mais pronunciada nas raízes (R1 e R2), no caule (C1) e nas folhas de plantas mais jovens, assim como nas sementes (S1) de frutos imaturos, na polpa (P1 e P2) e na casca (Cc1 e Cc2). Já no caule das plantas mais desenvolvidas (C2) e também nas sementes de frutos maduros (S2) não foi observada a prevalência de um gene em relação ao outro. No caule (C2), a expressão de *Cppgip4* alcançou $4,19 \times 10^{12}$ ($\pm 1,5 \times 10^{12}$) cópias do transcrito por miligrama de tecido, enquanto *Cppgip6* esteve próximo a $4,18 \times 10^{12}$ ($\pm 8,1 \times 10^{11}$)

cópias de transcrito por mg de tecido. Nas sementes de frutos maduros esses valores chegaram a $6,08 \times 10^{11}$ ($\pm 6,88 \times 10^{10}$) para *Cppgip4* e $5,43 \times 10^{11}$ ($\pm 7,7 \times 10^{10}$) para *Cppgip6*.

Figura 18. Número de cópias de *Cppgip4* e *Cppgip6* nas amostragens 1 (■) e 2 (▒) por mg de tecido (A) e por µg de RNA total (B) das raízes de plantas com 27 cm (R1) e 105 cm (R2); caule das plantas com 27 cm (C1) e 105 cm (C2); folhas de plantas com 27 cm (F1); das folhas das plantas com 105 cm (F2); de sementes (S1), casca (Cc1) e polpa (P1) de frutos aos 90 dias pós-antese (DPA) e das sementes (S2), casca (Cc2) e polpa (P2) de frutos no 2 DPC. Os valores foram determinados a partir da curva de calibração com DNA plasmidial contendo o inserto do gene de *Cppgip4* e de *Cppgip6* clonado a partir do vetor pTZ57R/T. Os valores apresentados correspondem às médias obtidas e as barras verticais representam o erro padrão (n= 5). Letras diferentes entre os diferentes tecidos indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças entre as amostragens são apresentadas no apêndice (Tabela 8).

Dentre os tecidos analisados, a polpa e a casca foram os que apresentaram maior acúmulo de transcritos. Para *Cppgip6* a diferença entre os valores de número de cópias de casca e polpa, atingindo valores próximos a $1,5 \times 10^{19}$, foram diferentes em cerca de 6 ordens de grandeza em relação aos níveis para os outros tecidos. Já para *Cppgip4* essa diferença não foi tão evidente, com os valores de expressão do gene na polpa e na casca sendo muito semelhantes àqueles observados em outros tecidos e da mesma ordem de grandeza. Para os outros tecidos, observa-se que as sementes da segunda amostragem foram as que apresentaram maiores valores de expressão, próximos a 5×10^{14} cópias de transcrito por miligrama de tecido, enquanto as raízes da segunda amostragem foram as que apresentaram os menores valores, que chegaram ao máximo de 1×10^{11} cópias de transcrito por massa de tecido.

A análise do gráfico aponta ainda as diferenças entre as fases de desenvolvimento de cada tecido, sendo possível observar as variações que existem entre as plantas mais desenvolvidas e as menos desenvolvidas. Para ambos os genes, todos os tecidos apresentaram uma redução dos níveis de expressão à medida que estes se desenvolveram, exceto para a expressão de *Cppgip4* no caule (C1 e C2) e nas sementes (S1 e S2) da segunda amostragem, em que os valores de expressão apresentam-se numericamente muito semelhantes ou se elevaram. As variações mais acentuadas ocorreram na expressão de *Cppgip4* na polpa (P1 e P2) e em *Cppgip6* nas folhas (F1 e F2), na polpa (P1 e P2) e na casca (Cc1 e Cc2).

Quando se analisam os resultados de número total de cópias de transcrito por micrograma de RNA total presente nos tecidos, os resultados expressam valores corrigidos pelas quantidades desse ácido nucleico presente na referida massa de tecido vegetal utilizado para a análise. Essa comparação visa excluir as diferenças que podem existir devido à composição estrutural e celular do tecido e também à sua atividade metabólica e que podem não ser consideradas na comparação direta a partir dos níveis de transcrito por massa de tecido. Dessa comparação entre os valores normalizados com base no RNA resultaram os valores de expressão dos genes apresentados na Figura 18B.

As taxas de expressão de *Cppgip6* foram relativamente mais altas que as de *Cppgip4* na maioria dos tecidos avaliados e apresentaram um perfil muito semelhante ao encontrado na análise que considerou o número de cópias por massa de tecido. O acúmulo de transcritos de *Cppgip6* foi mais elevado que *Cppgip4* em todos os tecidos, com exceção das folhas (F1 e F2) da segunda amostragem de

F2 na primeira amostragem. Na comparação entre os tecidos, a polpa e a casca novamente apresentaram os maiores níveis de expressão tanto para *Cppgip4* quanto para *Cppgip6*, sendo seguidos pela raiz, no caso de *Cppgip6*, e mostrando que, para o cálculo com base na quantidade de RNA, os valores assumem outra escala e o número de cópias dos transcritos de PGIPs na raiz passa a prevalecer sobre o da folha.

Assim como foi comentado para a análise de transcritos por massa de tecido, observa-se uma tendência à diminuição da expressão à medida que o tecido vai se desenvolvendo, para ambos os genes. Em todos os tecidos ocorreu uma diminuição da expressão, à exceção do caule, que apresentou um aumento de *Cppgip4* nas amostras do caule menos desenvolvido (C1) para as do caule mais desenvolvido (C2).

Com base nos resultados obtidos é possível sugerir que a expressão dos genes de PGIP em mamoeiro parece seguir um padrão tecido-específico, e, de uma maneira geral, os tecidos jovens e com maior atividade metabólica apresentaram maior número de cópias de transcritos, ainda que a comparação feita com base no RNA total tenha revelado diferenças menos marcantes. É possível que essas diferenças entre os níveis dos transcritos ao longo do desenvolvimento reflitam a demanda por maior efeito protetor nos tecidos mais jovens, em razão da suscetibilidade e da vulnerabilidade aumentada ao ataque por fitopatógenos, o que reforça a ideia de que as PGIPs são um elemento importante no sistema de defesa vegetal.

Em outras espécies vegetais também foi observado que a expressão de PGIPs geralmente é diferenciada entre as diversas partes da planta. Em framboesas (JOHNSTON et al., 1993), a expressão de PGIP na flor não foi detectada e nos frutos ocorreu um decréscimo à medida que o fruto amadureceu. Em maçãs (ZHANG et al. 2010), a expressão foi mais elevada nas folhas e nos frutos, enquanto no caule a expressão foi muito diminuída. Em amoras (HU et al., 2012), a expressão de PGIPs foi mais abundante em folhas e frutos jovens quando comparados a folhas e frutos maduros. No caso do mamoeiro, uma vez que sua expressão foi constitutiva e que a análise foi feita em plantas em pleno crescimento, cultivadas em campo e em frutos sadios, e que não passaram por nenhum tratamento pós-colheita, e que ela variou conforme o estágio de desenvolvimento e maturidade do tecido, pode-se inferir que os padrões de expressão observados nessa planta respondem a uma

diversificação funcional dos genes, e que podem ser derivadas de regulações distintas. Essas variações já foram percebidas por outros autores (D'OVIDIO et al., 2004; 2006; LI et al., 2003; FERRARI et al., 2003) e indicam uma expressão diferencial dos genes em resposta à necessidade específica de cada tecido.

O padrão de atividade metabólica, a idade do tecido, o contato com patógenos específicos do solo ou propagados pelo vento, bem como a separação espacial dos tecidos, podem ser alguns dos fatores responsáveis pela diferenciação em termos da expressão dos genes de PGIPs do mamoeiro. Isso poderia explicar as diferenças notadas para as raízes em relação ao caule e às folhas, ou mesmo entre os frutos e os demais tecidos analisados, e poderia indicar uma especialização voltada para a síntese de proteínas de defesa contra microrganismos específicos e seus diversos níveis de agressividade quando em contato com a parede celular vegetal. A expressão constitutiva poderia favorecer o sistema de defesa da planta como um todo, mas essa especialização tecido-específica e, em especial daqueles órgãos ou tecidos mais vulneráveis ao ataque fúngico, poderia conferir uma resposta rápida e provavelmente mais eficiente contra o avanço da infecção.

É provável que esse padrão de expressão constitutivo também seja notado ao longo da fase reprodutiva, em que a proteção conferida pelas PGIPs se faria extremamente necessária, uma vez que as reservas do tecido vegetal são direcionadas para o florescimento e a frutificação. A comparação dos padrões de expressão entre os tecidos da planta quando esta se encontra na fase reprodutiva e a expressão dos genes nos frutos possibilitaria uma análise temporal global da expressão das PGIPs mais aprofundada. No entanto, a amostragem e transporte de plantas com maiores dimensões, já em fase de floração e frutificação é inviável, o que impossibilitou o uso desse tipo de material para a comparação direta dos níveis de expressão dos genes. Apesar disso, os resultados obtidos mostraram diferenças dos níveis de transcritos de PGIPs do mamoeiro em relação à idade de plantas mesmo na fase vegetativa.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CpPGIP EM *P. pastoris*

Os clones de pPICZaB+Cp*pgip4* e pPICZaB+Cp*pgip6* em *E.coli* gerados a partir das construções otimizadas produzidas pela GenScript foram crescidos em meio líquido e os resultados gerados pelo “PCR colony” estão descritos na figura 19.

Estes resultados confirmaram a presença dos genes dentro do plasmídeo pois geraram fragmentos de tamanho maior (~1500 pb) que o esperado para as sequências (~980 pb) e para o caso de plasmídeos que não receberam nenhuma inserção do gene, pois a amplificação se deu a partir da amplificação com os iniciadores 5'AOX e 3'AOX (Figura 19) que pareiam em regiões dentro do vetor e externas à sequência.

Figura 19. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos do “PCR colony” de alguns dos clones de pPICZαB + *Cppgip4* (1 a 3) e de pPICZαB + *Cppgip6* (4 a 6) utilizando os iniciadores 5'AOX e 3'AOX. Os fragmentos obtidos foram visualizados por coloração com ‘SYBR Safe’. Os números da esquerda referem-se aos tamanhos (pb) das bandas do padrão de peso molecular de DNA (M) próximas ao tamanho do amplicon obtido.

Após a detecção do crescimento e da inserção satisfatória dos genes nos plasmídeos, foram realizados testes com a finalidade de se determinar o fenótipo de cada clone crescido na placa. Alguns desses clones foram semeados em placas contendo meios seletivos para as culturas de modo a indicar o fenótipo gerado. O cultivo em placas MDH e MMH foi realizado tanto para as construções de pPICZαB + *Cppgip4* quanto para pPICZαB + *Cppgip6*, sendo que ambos apresentaram o mesmo resultado fenotípico. Os resultados para as construções contendo o primeiro gene apenas estão demonstrados na figura 20.

Os resultados indicam que as colônias cresceram mais lentamente nas placas contendo metanol como única fonte de carbono (Figura 20 B), indicando o fenótipo Mut^s para todas as transformações ocorridas.

Figura 20. Análise fenotípica de *P. pastoris* transformadas com a construção pPICZαB + *Cppgip4*. As colônias foram crescidas em meio MDH (A) e em meio MMH (B) durante 48 horas para a determinação dos fenótipos Mut ou Mut⁺. Cada placa foi dividida em oito setores e em cada um deles foi estriada parte de uma colônia positivamente transformada.

Esse fenótipo é caracterizado por apresentar uma recombinação no gene *aox1* selvagem, gerando transformantes que utilizam metanol de forma lenta (CREGG et al., 1993). O crescimento mais evidente é percebido na placa contendo meio rico em glicerol (Figura 20- A) indica que os clones que tiveram o gene *aox1* interrompido utilizam-se de fontes alternativas de assimilação de carbono, fazendo uso do glicerol presente no meio. Essa informação é importante pois direciona a escolha do protocolo de indução, uma vez que definirá o volume dos meios de cultura e o tempo de indução em metanol. Clones do fenótipo Mut^s necessitam de um maior volume de meio BMGY para que a massa de células seja grande o suficiente para que, mesmo com baixa utilização do metanol durante a indução com BMMY, haja expressão eficaz de proteínas e que elas possam ser detectadas se a indução ocorrer em tempo longo o suficiente. Por outro lado, clones com fenótipo Mut⁺ requerem crescimento celular em pequenos volumes de meio BMGY e indução em tempo curto em grande volume de BMMY para que não haja saturação do mesmo, já que a produção de proteínas é mais rápida e em maior quantidade.

Após a detecção do fenótipo, a indução foi realizada conforme o protocolo descrito em métodos e após 6 dias foi verificado o perfil eletroforético das proteínas

presentes no sobrenadante da cultura e também no precipitado obtido após centrifugação, como forma de avaliar qualitativamente a expressão de PGIP em *P. pastoris*. Os resultados obtidos para os testes de indução com CpPGIP4 estão na figura 21.

Figura 21. Separação eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5% dos extratos de *P. pastoris* transformada com a construção pPICZαB + CpPGIP4. **M:** Marcador: Unstained Protein Molecular weight marker (Fermentas Life Science). **1:** proteínas do sobrenadante do vetor desprovido de inserto. **2:** proteínas do precipitado do vetor desprovido de inserto. **3:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **4:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **5:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **6:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **7:** proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). **8:** proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). A seta a direita indica a possível localização da proteína de interesse (~37KDa)

De acordo com a ferramenta Compute pI/MW, o tamanho da proteína estimada seria de aproximadamente 37 KDa (36564.50 KDa; pI 9,00), definidos a partir da sequência proteica predita e depositada no GenBank. No entanto, não foi identificada nenhuma banda predominante nesta altura em SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Brilliant Blue ou um padrão de bandas que se diferenciasse do perfil proteico do vetor desprovido de inserto (Figura 21, pistas 1 e 2).

Uma vez que as proteínas foram inseridas em um vetor que apresenta o fator alfa em sua sequência, inicialmente tentou-se localizar a proteína heteróloga no extrato proteico do sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* em meio líquido, por ser esse fator o responsável pela exportação do polipeptídeo a ele ligado após a

expressão. Como esse resultado não pôde ser obtido em uma primeira análise, foi preparada uma nova eletroforese na qual estivessem presentes tanto as amostras do sobrenadante quanto do precipitado de células. Considerando também a hipótese de que a proteína poderia estar aderida ao precipitado ou não tivesse sido exportada para o sobrenadante. Para a detecção específica da proteína-alvo com maior sensibilidade, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Figura 22) a qual foi testada com auxílio de anticorpos específicos para PGIP, porém obtidos a partir das proteínas de PGIP de feijão (MATTEI et al., 1996).

Figura 22. Western Blotting dos extratos de *P. pastoris* transformada com a construção pPICZαB + CpPGIP4. Foi utilizado o anticorpo anti-coelho para PvPGIP (anticorpo para PGIP de feijão) **M**: Marcador: Prestained Protein Molecular weight marker (Fermentas Life Science). **1**: proteínas do sobrenadante do vetor desprovido de inserto. **2**: proteínas do precipitado do vetor desprovido de inserto. **3**: proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **4**: proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **5**: proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **6**: proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **7**: proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). **8**: proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3).

Observa-se pela análise do Western Blotting que não houve reconhecimento de nenhuma proteína na altura esperada para PGIP com a utilização de um anticorpo específico para a PGIP do feijoeiro. Foram notadas apenas bandas fracamente coradas na altura entre 25 e 35 KDa (pistas 3, 5 e 7), o que pode ser explicado pela reação cruzada entre o anticorpo e outras proteínas produzidas por

P. pastoris. Como não existem anticorpos específicos para as PGIPs de mamoeiro, a inespecificidade das reações com anticorpos contra PGIPs de outros vegetais foi outro fator dificultador da detecção destas proteínas. Diante disso, uma alternativa seria a utilização de anticorpos específicos para a ligação com proteínas com cauda de histidina, uma vez que as construções foram feitas em um vetor com essa característica e os iniciadores não incluíram o códon de terminação, a fim de que essa cauda fosse inserida às sequências. Dessa maneira, um novo gel de poliacrilamida 12,5% foi preparado e testado agora para a utilização do anticorpo anti-HIS (Novagen), cujo resultado é apresentado na figura 23.

Figura 23. Western Blotting dos extratos de *P. pastoris* transformada com a construção pPICZαB + CpPGIP4. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-histidina (HIS-TAG) **M**: Marcador: Prestained Protein Molecular weight marker (Fermentas Life Science). **1**: proteínas do sobrenadante do vetor desprovido de inserto. **2**: proteínas do precipitado do vetor desprovido de inserto. **3**: proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **4**: proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 1). **5**: proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **6**: proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 2). **7**: proteínas do sobrenadante de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3). **8**: proteínas do precipitado de pPICZαB + CpPGIP4 (construção 3).

O resultado indica que o uso do anticorpo anti-histidina não reconheceu nenhuma proteína especificamente, gerando apenas bandas inespecíficas de coloração pouco intensa e que se distribuíram por toda a membrana, dificultando a análise confiável dos perfis proteicos obtidos ao longo da indução da expressão heteróloga de CpPGIP4 e CpPGIP6.

A ausência de um resultado consistente pode ser explicado por uma série de fatores que podem estar relacionados principalmente às condições de indução da expressão. Muitas variáveis, como o pH da reação, a temperatura, as condições de agitação e de aeração das culturas, a concentração de metanol adicionado, podem ter favorecido uma condição de toxicidade e consequente morte celular, provocando extravazamento das proteínas endógenas. Essa hipótese pode ter sido confirmada ao se observarem os resultados do perfil eletroforético que se caracterizou pelo aparecimento de inúmeras proteínas, controversamente ao que é conhecido para a expressão em *P. pastoris* já que esta levedura apresenta como principal característica a de ser um organismo que secreta poucas proteínas endógenas em condições ideais de indução (BALAMURUGAN, REDDY e SURYANARAYANA, 2007). É descrito ainda na literatura que outros fatores como a diminuição da resistência celular, a instabilidade do plasmídeo e também a lise celular podem ser fatores limitantes à produção de uma proteína heteróloga e estão aliados a fatores relacionados à carga metabólica exigida para a expressão desses genes exógenos (HEYLAND et al., 2011).

4.6 ATIVIDADE DE PGIP POR DIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

Para a medida da capacidade inibitória de PGIPs do mamoeiro sobre a atividade enzimática de PGs fúngicas, foi utilizado o método de difusão em ágar. Neste método, as amostras são aplicadas em poços perfurados em uma placa contendo um gel à base de agarose e que contém o substrato para a atividade das PGs, o ácido poligalacturônico.

Nessas placas, as amostras que continham pectinase comercial, representante da enzima alvo da inibição enzimática foram incubadas juntamente com os extratos proteicos da polpa e da casca dos frutos obtidos em diferentes pontos do desenvolvimento. Esses extratos foram misturados e a atividade anti-PG foi verificada pela capacidade do extrato proteico de inibir a atividade da pectinase sobre o ácido poligalacturônico. A reação da enzima com o substrato foi detectada por meio da coloração das placas com vermelho de rutênio que é um corante que tem a capacidade de se ligar ao ácido poligalacturônico. A atividade foi então detectada nas regiões onde ocorreu reação de inibição da enzima e que, por diferença de coloração, indica a não-ligação do corante ao substrato. O indicador de

reação enzimática da pectinase foi a formação de halos esbranquiçados, ou não corados, ao redor dos poços onde foram aplicadas as amostras. O resultado dessa atividade está apresentado nas figuras 24 e 25, que evidenciam, respectivamente, as imagens das placas observadas no experimento e os valores estimados de porcentagem de inibição.

Figura 24. Avaliação da inibição da atividade de pectinase comercial de *Aspergillus niger* por PGIP de mamão determinada pelo ensaio de difusão radial em gel de agarose contendo ácido poligalacturônico. As regiões claras nas placas relativas à descoloração no gel indicam a zona de ocorrência da atividade da pectinase. **A:** Ensaio da atividade inibitória de PGIP em extrato de proteína da casca amostragem 1 e da **(B)** casca da amostragem 2. **C:** Ensaio da atividade inibitória de PGIP em extrato de proteína da polpa amostragem 1 e da **(D)** polpa da amostragem 2. Números de 1 a 5: apenas o extrato proteico, de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente; 6 a 10: controle contendo pectinase *in natura* + extrato proteico fervido de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente; 11 a 15: pectinase *in natura* + extrato proteico de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente; 16 a 20: controle contendo pectinase fervida + tampão de ressuspensão.

Figura 25. Porcentagem de inibição da atividade de pectinase comercial de *Aspergillus niger* por PGIP determinada pelo ensaio de difusão radial em gel de agarose e medida a partir da medida do diâmetro (■) do halo formado na zona de ocorrência da reação e também da intensidade de cor por área (■). Os resultados são expressos em porcentagem de inibição (%) obtida a partir da diferença da medida do halo formado ao redor dos poços que continham apenas o extrato proteico e o controle contendo pectinase fervida + tampão de ressuspensão e da medida do halo formado ao redor dos poços contendo pectinase *in natura* + extrato proteico fervido de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente e pectinase *in natura* + extrato proteico de 30 DPA a 9 DPC, respectivamente. Cada valor corresponde à média de uma triplicata técnica. As barras verticais indicam o erro padrão.

De acordo com a figura 24, a análise da casca (A e B) e da polpa (C e D) revelou que os halos formados pela inibição da atividade da pectinase, na mistura de pectinase e extrato proteico *in natura* (11 a 15) foram, em sua maioria, menores que aqueles formados quando a pectinase foi misturada ao extrato fervido (6 a 10), ou seja, o extrato proteico do mamão apresentou proteínas em sua composição capazes de inibir a atividade da pectinase. A análise da capacidade inibitória das PGIPs do extrato de mamão sobre a atividade da enzima fúngica indicou que não apenas o valor do diâmetro do halo formado a partir da degradação do ácido poligalacturônico, mas também a intensidade na cor dos mesmos influencia na

análise dos resultados. Dessa maneira, foi considerada a análise dos dois parâmetros para melhor definir o padrão de resposta de PGIPs. Na casca, principalmente, observa-se que os halos formados na mistura contendo pectinase e extrato proteico *in natura* apresentaram coloração menos intensa que aqueles formados na mistura entre a pectinase e o extrato fervido. Essa diferença deve-se à distribuição da pectinase ao longo de todo o volume do halo e, por consequência do gel. Uma vez que o gel apresenta uma altura considerável dentro da placa (4 mm de altura), a difusão das misturas deve ser avaliada não apenas em termos de área de difusão, mas também a intensidade da cor formada após o tratamento com vermelho de rutênio pois volume ocupado pela mistura no gel, resulta em diferenças em termos de migração e de capacidade de degradação do ácido poligalacturônico.

Observa-se ainda que em algumas amostras ocorreu a formação de halo também nos poços onde foram aplicados somente os extratos *in natura* (todas as imagens de 1 a 5). A amostra da polpa aos 9 DPC da amostragem 1 (C-5), por exemplo, apresentou um halo muito evidente. Esse resultado, indicando a reação do extrato proteico com o ácido poligalacturônico presente no gel pode ser explicado pela presença de pectinases endógenas extraídas do tecido vegetal, o que é coerente com o acúmulo de pectinases, principalmente na polpa, à medida que o fruto amadurece. Na impossibilidade de se isolar a influência da atividade dessas pectinases endógenas, os halos formados em poços que continham apenas o extrato proteico foram considerados no cálculo da porcentagem de inibição para que a atividade dessas enzimas endógenas não influenciasse na análise do resultado.

Os resultados referentes às porcentagens de inibição demonstrados (Figura 25) mostram que quando avaliada em termos de intensidade de cor por área, parece ocorrer um aumento na inibição com o passar do desenvolvimento até o momento em que o fruto está fisiologicamente viável para a colheita (1 DPC). Isso ocorre de forma similar para os dois tecidos e para as duas amostragens. Após o 1 DPC, essa porcentagem de inibição tende a diminuir, atingindo os menores valores da análise aos 9 DPC. De maneira semelhante, os resultados de porcentagem de inibição calculados a partir do diâmetro do halo formado pela atividade enzimática mostram uma diminuição com o passar do amadurecimento, com exceção dos resultados encontrados para a casca dos frutos da amostragem 1. Basicamente, é possível dizer que a atividade inibitória revelou uma diminuição durante o amadurecimento.

Essa diminuição, tanto na porcentagem de inibição calculada pelo diâmetro quanto aquela calculada a partir da intensidade de cor por área, é condizente com os resultados de expressão dos genes por qPCR, a partir dos dois tecidos do fruto, ainda que a atividade de PGIPs obtida por extração não esteja necessariamente contemplando as mesmas ou todas as proteínas originadas dos genes putativos identificados neste estudo.

Foi possível ainda notar diferenças entre a porcentagem de inibição e, por conseguinte, entre a capacidade inibitória das amostras extraídas da polpa e da casca, onde a primeira apresentou maior capacidade de inibição em relação às amostras extraídas da casca, novamente concordando com os resultados das análises de expressão absoluta apresentados anteriormente.

Sabe-se que o nível de especificidade das PGIPs frente às pectinases pode ser bastante variado quando comparados diferentes tecidos e também em termos de agressividade de infecção causada por diferentes fitopatógenos. É importante salientar ainda, que a utilização de pectinases comerciais, que podem ser compostas por um conjunto de enzimas com atividade pectinolítica de um determinado fungo pode influenciar na análise da interação PGIP-PG. Assim, respostas mais claras podem ser obtidas com uma condição específica de ensaio entre a poligalacturonase fúngica alvo da inibição e as proteínas do extrato vegetal. Essa diferença quanto ao tipo de pectinase ensaiada pode explicar a menor resposta de inibição da atividade da pectinase frente a presença do extrato proteico de mamão em relação aos resultados encontrados por outros autores (AGÜERO et al., 2005; GREGORI et al., 2008; JANNI et al., 2008; BENEDETTI et al., 2011) que observaram inibições de quase 100% da atividade de pectinases específicas, uma vez que foram utilizados extratos que continham apenas poligalacturonases extraídas de somente um tipo de isolado fúngico.

Assim, dentre as limitações do ensaio realizado em PGIPs do mamão temos o grau de especificidade da reação, uma vez que foi utilizada uma mistura comercial de pectinases, que abrange uma série dessas enzimas e que pode alterar o perfil de reação com o ácido poligalacturônico, além de serem enzimas extraídas de um fungo que não é o principal agente causador de grandes danos nos tecidos do mamão, sendo considerado um fitopatógeno oportunista nesses frutos, além do método não ser muito sensível para a detecção de pequenas diferenças de efeito inibidor. Apesar disso, o perfil de resposta do contato do extrato proteico com a

mistura enzimática indicou que ocorre inibição e que esta pode ser influenciada pela idade fisiológica e pela abundância da proteína no tecido. A diferença em termos de eficiência de inibição, se comparada aos resultados apresentados por outros autores, também pode ser justificada pela baixa abundância dessa proteína no tecido vegetal saudável, uma vez que os mamões não apresentam sinais de infecção. Uma inibição mais significativa poderia ser encontrada em tecidos que tenham sido induzidos, a partir de indutores típicos (ácido salicílico, metil jasmonato) ou mesmo pelo contato direto com patógenos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise *in silico* foram identificadas duas sequências candidatas a PGIPs que atenderam a todos os critérios estabelecidos por características atribuídas a essas proteínas. Ambos os genes foram clonados e após a confirmação das sequências, foram utilizados para as análises de expressão gênica e de atividade anti-enzimática.

As análises de expressão revelaram diferenças entre as duas sequências gênicas estudadas e demonstraram que as PGIPs do mamoeiro apresentam níveis basais de expressão independentemente da existência de processos infecciosos no fruto e na planta. Esses resultados foram obtidos a partir dos valores de expressão gênica calculados com a utilização de genes de referência, essenciais para a correta estimativa de valores com base em taxas de expressão ubíquas durante o desenvolvimento das plantas.

Mesmo em frutos saudáveis, a variação da expressão, em termos de tecido analisado, fase de maturidade e também de amostragem indicou que, apesar de pertencerem a uma mesma família gênica, *Cppgip4* e *Cppgip6* apresentam diferença em termos de quantidade e de padrão de expressão ao longo das fases estudadas. Foi observado que o padrão de expressão apresentou uma diminuição com o passar do desenvolvimento, apontando para uma relação inversamente proporcional do grau de maturidade do tecido com o perfil de expressão de ambos. *Cppgip4* apresentou maiores variações nos níveis de expressão relativa quando comparados com *Cppgip6*, e essa diferença foi mais elevada na polpa do que na casca. Esse fato foi observado tanto para o cálculo utilizando o gene da ubiquitina (UBQ) quanto para o fator de alongação (TEF).

Os perfis de transcritos de PGIPs na raiz, no caule, na folha, na semente, casca e polpa do mamoeiro de plantas crescidas em condições normais de cultivo indicaram que os padrões de expressão se diferenciaram tanto em termos de fase de desenvolvimento quanto em tecido, em geral com prevalência de *Cppgip6*, em relação aos frutos e também quando comparado à *Cppgip4*. A análise comparativa da expressão absoluta dos diversos órgãos e tecidos estudados, revelou que a expressão dos dois genes ocorreu em todos eles, sendo que a prevalência em termos de número de transcritos continuou sendo da polpa e da casca, o que indica que ambos sejam os tecidos onde a expressão dos genes de PGIPs pode ser mais

relevante para a proteção contra o ataque fitopatogênico. De maneira geral, esses resultados indicam que a expressão dos genes de PGIP no mamoeiro é ubíqua nos diversos tecidos e sugestivos de que ela poderia responder de maneira efetiva para o controle do ataque fúngico.

Em consonância com os resultados da expressão dos genes, a atividade das PGIPs extraídas diretamente da casca e da polpa demonstraram que há uma tendência à diminuição da capacidade inibitória à medida que o fruto amadurece. No entanto, a análise da expressão heteróloga, que poderia responder diretamente acerca da capacidade inibitória das proteínas resultantes da expressão de *Cppgip4* e *Cppgip6* ainda não foi elucidada para que se pudesse avaliar com maior precisão o papel dos mesmos nos mecanismos protetores contra o avanço das infecções

Diante desses resultados é possível concluir que esses genes, antes de serem responsivos à presença de agentes infecciosos, são expressos de forma ubíqua no mamoeiro, podendo ser regulados em virtude da presença de diferentes agentes elicitores, porém, em condições naturais, sendo alterados com o passar do desenvolvimento, e por serem regulados de maneira diferente, podem apresentar habilidades distintas de interação com as PGs de fungos. A redução nos valores de expressão, concomitante com o passar do amadurecimento, pode indicar que PGIPs, além de outros sistemas de defesa, podem estar relacionadas ao aumento da susceptibilidade decorrente das fases mais avançadas do amadurecimento e que marcam a preponderância dos processos degradativos do tecido. Nesse sentido, a diminuição da expressão de um gene relacionado à defesa do vegetal poderia torná-lo mais acessível aos processos infecciosos quando a fase de senescência prevalece.

6 REFERÊNCIAS

ABU-GOUKH A.A.; STRAND L.L.; LABAVITCH J.M. Development-related changes in decay susceptibility and poligalacturonase inhibitor content of “Bartlett” pear fruit. *Physiol. Plant Pathol.* v.23, p. 101–109, 1983.

AGUERO, C.B.; URATSU, S.L.; GREVE, C.; POWELL, A.L.T.; LABAVITCH, J.M.; MEREDITH, C.P.; DANDEKAR, A.M. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and Botrytis in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology*, v.6 (1), p. 43-51, 2005.

AHARONI, A.; KEIZER, L.C.P.; VAN DEN BROECK, H.C.; BLANCO-PORTALES, R.; MUNÓZ-BLANCO, J.; BOIS, G.; SMIT, P.; DE VOS, R.H.C.; O'CONNEL, A.P. Novel insight into vascular, stress and auxin-dependent and – independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol* v.129, p. 1019–1031, 2002.

AKAMINE, E.K.; ARISUMI, T. Control of post-harvest storage decay of fruits of papaya (*Carica papaya* L.) with special reference to their effect of hot water. *P. Am Soc. Hortic. Sci.* v.61, p.270-274, 1953.

ALTSCHUL, S.F.; GISH W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. of Mol. Biol.*, v. 215: p. 403-407, 1990.

ALVAREZ, A.M.; NISHIJIMA, W.T. Postharvest diseases of papaya. *Plant Dis.*, St. Paul, v.71, n.7, p.681-686, 1987.

ALVES, R.E.; SOUZA FILHO, M.de S.M. de; BASTOS, M.S.R.; FILGUEIRAS, H.A.C.; BORGES, M. de F. Pesquisa em processamento mínimo de frutas no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2, 2000. Palestras...Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p.75-88.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64, p.5245-5250, 2004.

BALAMURUGAN, V.; REDDY,G.R.; SURYANARAYANA, V.V.S. Pichia pastoris: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines. *Indian Journal of Biotechnology* v. 6, p. 175-186 2007.

BASTOLLA,F.Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em Eucalyptus. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

BJELLQVIST, B.; HUGHES, G.J.; PASQUALI, CH.; PAQUET, N.; RAVIER, F.; SANCHEZ, J.-CH.; FRUTIGER, S. & HOCHSTRASSER, D.F. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* v.14, p.1023-1031, 1993.

BENEDETTI, M.; LEGGIO, C.; FEDERICI, L.; DE LORENZO, G.; PAVEL, N.V.; CERVONE F. Structural resolution of the complex between a fungal polygalacturonase and a plant polygalacturonase-inhibiting protein by Small-Angle X-Ray Scattering. *Plant Physiol*, v.157, p. 599-607, 2011.

BCM Search Launcher disponível em: (<http://ca.expasy.org/tools/>) acessado em: janeiro-abril 2010.

BLAST disponível em: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) acessado em: janeiro-julho-2010/ junho-agosto-2011.

BLEINROTH, E.W. Determinação do ponto de colheita. In: Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Mamão para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA–SPI, 1995. p.10-25. (Publicações técnicas FRUPEX; 14).

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; LAM, B. C-H. Early signal transduction pathways in plant–pathogen interactions. *Trends in plant Science*. v. 3 p. 342–346, 1998.

BOLKAN, H. A.; CUPERTINO, F. P.; DIANESE, J. C.; TAKATSU, A. Fungi associated with pre and post harvest fruit rot of papaya and their control in Central Brazil. *Plant Dis. Reporter*, v. 60, p. 605-609, 1976.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

BRON, I. U.; JACOMINO, A. P.; PINHEIRO, A. L. Influence of ripening stage on physical and chemical attributes of 'Golden' papaya fruit treated with 1-Methylcyclopropene. *Bragantia* (São Paulo), v. 65, p. 553-558, 2006.

BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, M.H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* v. 47, p. 311–340, 2001.

CERVONE, F.; DE LORENZO, G.; DEGRÀ, L.; SALVI, G.; BERGAMI, M. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol*. v. 85, p. 631-637, 1987.

CERVONE, F.; HAHN, M. G.; LORENZO, G.; DARVILL. A.; ALBERSHEIM, P. Host pathogen interaction. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense response. *Plant Physiol*. v.90 p. 542-548, 1989.

CHENG, Q.; CAO, Y.; PAN, H.; WANG, M.; HUANG, M. Isolation and characterization of two genes encoding polygalacturonase-inhibiting protein from *Populus deltoides*. *J Genet Genomics*. v.35, p. 631-638, 2008.

CHIMWAMUROMBE, P.M.; BOTHA, A.-M.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D. Molecular relatedness of the polygalacturonase inhibiting protein genes in *Eucalyptus* species. *Theor. Appl. Genet.* v.102, p.645–650, 2001.

CLUSTALW disponível em: (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) acessado em: abril-julho 2010.

COOK, B.J.; CLAY, R.P.; BERGMANN, C.W.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* v. 12, p. 703–711, 1999.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* v.11, p. 905-910, 1993.

D'OVIDIO, R.; RAIOLA, A.; CAPODICASA, C.; DEVOTO, A.; PONTIGGIA, D.; ROBERTI, S.; GALLETTI, R.; CONTI, E.; O'SULLIVAN, D.; DE LORENZO, G. Characterization of the complex locus of *Phaseolus vulgaris* encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) reveals sub-functionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiol* v.135, p.2424–2435, 2004.

D'OVIDIO, R.; ROBERTI, S.; DI GIOVANNI, M.; CAPODICASA, C.; MELARAGNI, M.; SELLA, L.; TOSI, P.; FAVARON, F. The characterization of the soybean Pgip family reveals that a single members is responsible for the activity detected in soybean tissues. *Planta*, v.224 , p.633-645, 2006.

DE LORENZO, G., FERRARI S. Polygalacturonase inhibiting proteins in defence against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v.5, p.1–5, 2002.

DE LORENZO, G.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D.; CAPRARI, C.; CLARK, A. J.; DESIDERIO, A.; DEVOTO, A.; FORREST, R.; LECKIE, F.; NUSS, L.; SALVI, G. Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem. Soc. Trans.* v.22, p. 394-397, 1994.

DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F.: The role of polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* v. 39, p. 313-335, 2001.

DEVOTO, A.; CLARK, A.J.; NUSS, L.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. Developmental and pathogen-induced accumulations of transcripts of polygalacturonase-inhibiting protein in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* v.202, p. 284–292, 1997.

DI MATTEO, A.; BONIVENTO, D.; TSERNOGLOU, D.; FEDERICI, L.; CERVONE, F. Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. *Phytochem.* v. 67, p. 528-533, 2006.

DI MATTEO, A.; FEDERICI, L.; MATTEI, B.; SALVI, G.; JOHNSON, K. A.; SAVINO, C.; DE LORENZO, G.; TSERNOGLOU, D. The crystal structure of polygalacturonase- inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *P. Nat.l Acad. Sci. USA.* v. 100, p. 10124-10128, 2003.

DI, C.; ZHANG, M.; XU, S.; CHENG, T.; AN, L. Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense. *Crit. Ver. Microbiol.* v.32, p. 91-100, 2006.

DICKMAN, K.B. (1994). Part V. Papaya: Anthracnose. pp. 58-59 *In: Compendium of Tropical Fruit Diseases.* Ploetz, R.C. Zentmyer, G.A., Nishijima, W.T. Rohrbach, K.G. & Ohr, H.D. (Eds.) APS Press, St Paul, Minnesota.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* v.32, p. 479–501, 1994.

DOYLE, J.J., DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; BOUDART, G.; DUMAS, B. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiol. Bioch.*, v.38, p. 157-163, 2000.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M., BORGES, A. A., BORGES-PÉREZ, A., & PÉREZ, J. A. Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: The *ToFZY* gene family. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 49(7), p.782-791, 2011.

FABI J.P.; CORDENUNSI B.R.; BARRETO G.P.M.; MERCADANTE A.Z.; LAJOLO F.M.; NASCIMENTO J.R.O. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). *J. Agric. Food Chem.*, v. 55: p. 6118-6123, 2007.

FABI, J. P.; SEYMOUR, G. B.; GRAHAM, N. S.; BROADLEY, M. R.; MAY, S. T.; LAJOLO, F. M.; DO NASCIMENTO, J. R. O. Analysis of ripening-related gene expression in papaya using an Arabidopsis-based microarray. *BMC Plant Biology*, v. 12, 242, 2012.

FABI, J.P.; CORDENUNSI, B. R.; SEYMOUR, G. B.; LAJOLO F.M.; NASCIMENTO, J. R. O. Molecular cloning and characterization of a ripening-induced polygalacturonase related to papaya fruit softening. *Plant Physiol. Bioch.*, (Paris), 2009b.

FABI, J.P.; LAJOLO F.M.; NASCIMENTO, J. R. O. Cloning and characterization of transcripts differentially expressed in the pulp of ripening papaya. *Sci Horticult.*, v. 121, p. 159-165, 2009a.

FAVARON, F.; OVIDIO, R.; PORCEDDU, E.; ALGHISI, P. Purification and molecular characterisation of a soybean polygalacturonase inhibiting protein. *Planta*. v. 195, p. 80–87, 1994.

FEDERICI, L.; CAPRARI, B.; SAVINO, C.; DI MATTEO, A.; DE LORENZO, G.; CERVONE, F.; TSEMOGLOU, D. Structural requirements of endopolygalacturonases for the interaction with PGIP (Polygalacturonase-inhibiting protein). *P Natl A Sci*, v.98, p. 13425-13430, 2001.

FEDERICI, L.; DI MATTEO, A.; FERNANDEZ-RECIO, J. TSERNOGLOU, D.; CERVONE, F. Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *Trends Plant Sci*. v. 11, p. 65-70, 2006.

FERRARI, S., VAIRO, D., AUSUBEL, F.M., CERVONE, F., DE LORENZO, G. Arabidopsis polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIP) are regulated by different signal transduction pathways during fungal infection. *Plant Cell* v.15, p.93–106, 2003.

FISH, W.W., DAVIS, A.R. The purification, physical/chemical characterization, and cDNA sequence of cantaloupe fruit polygalacturonase – inhibiting protein. *Phytopathol.*94, p.337–344, 2004.

FREDIANI, M.; CREMONINI, R.; SALVI, G.; CAPRARI, C.; DESIDERIO, A.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. Cytological localization of the *pgip* genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* v. 87, p. 369-373, 1993.

FORLENZA, M., KAISER, T., SAVELKOUL, H. F., & WIEGERTJES, G. F. The Use of Real-Time Quantitative PCR for the Analysis of Cytokine mRNA Levels. In: *Cytokine Protocols* p. 7-23, 2012.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of Colletotrichum species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant disease*, v.82, p. 596-605, 1998.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005.

GAYET, J. P.; BLEINROTH, E. W.; MATALLO, M. et al. Mamão para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA - FRUPEX, 1995. 38p.

GENAMICS EXPRESSION disponível em: <http://genamics.com/expression/index.htm> acessado em: janeiro-maio 2010.

GODORNES, C., LEADER, B.T., MOLINI, B.J., CENTURION-LARA, A. LUKEHART, S.A. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* v. 38, p. 1-7, 2007.

GOMATHI, V.; GNANAMANICKAM, S.S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence. *Curr Sci.* v.87, p. 1211-1217, 2004.

GREGORI, R.; MARI, M.; BERTOLINI, P.; SAÑUDO BARAJAS, J.A.; TIAN, J.B.; LABAVITCH, J.M. Reduction of Colletotrichum acutatum infection by a polygalacturonase inhibitor protein extracted from apple. *Postharvest Biol and Technol.* v.48, p. 309–313, 2008.

GUO, F., ZHOU, W., ZHANG, J., XU, Q., & DENG, X. Effect of the citrus lycopene β -cyclase transgene on carotenoid metabolism in transgenic tomato fruits. *PloS one*, v. 7,p. (2012).

GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; KING, D.; KEMP, G.; BERGMANN, C. SPR and differential proteolysis/MS provide further insight into the interaction between PGIP2 and EPGs. *Fungal Biol.* v.7, p. 737-46, 2012.

HEYLAND, J.; FU, J.; BLANK, L. M.; SCHMID, A. Carbon metabolism limits recombinant protein production in Pichia pastoris. *Biotechnol. Bioeng.* v.108, p.1942–1953, 2011.

HU,D.; DAI,R.; WANG,Y.; ZHANG, Y.; LIU, Z.; FANG, R.; ZHAO, W.; LI, L.; LIN, Q.; LI, L Molecular Cloning, Sequence Analysis, and Expression of the Polygalacturonase-inhibiting Protein (PGIP) Gene in Mulberry. *Plant Mol Biol Rep* v.30, p. 176-186, 2012.

HUANG, Y.; DEVERALL, B.J.; TANG, W.H.; WANG, W.; WU, F.W. Foliar application of acilbenzolar-S-methyl and protection of postharvest Rock melons and Hami melon from disease. *Eur J Plant Pathol.* V. 106, p. 651-656, 2000.

JACOMINO, A. P.; TREVISAN, M. J.; ARRUDA, M. C.; KLUGE, R. A. Influência do intervalo entre a colheita e a aplicação do 1-Metilciclopropeno no controle do amadurecimento de mamão. *Rev Bras Frutic*, v. 29, p. 000-004, 2007.

JANNI, M.; SELLA, L.; FAVARON, F.; BLECHL, A. E.; DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R. The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen Bipolaris sorokiniana. *Molecular plant-microbe interactions*, v. 21(2), p. 171-177, 2008.

JOBLING, J. Temperature management is essential for maintaining produce quality. *Good Fruit and Vegetables Magazine.* Melbourne, v.10, p.30-31, 2000.

JOHNSTON, D.J.; RAMANATHAN, V.; WILLIAMSON, B. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from Botrytis cinerea and other micro-organisms. *J of Experim Bot.* v.44, p. 971-976, 1993.

JOHNSTON, D.J.; WILLIAMSON, B.; MCMILLAN, G.P. The interaction in planta of PGs from *Botrytis cinerea* with a cell wall-bound polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) in raspberry fruits. *J. of Experim. Bot.* v. 45, p.1837–1843, 1994.

JONES, D.A.; JONES, D.G. The role of leucine-rich repeats in plant defences. *Adv Bot Res.* v. 24, p. 90– 156, 1997.

JOUBERT, D.A.; SLAUGHTER, A.R.; KEMP, G.; BECKER, J.V.W.; KROOSHOF, G.H.; BERGMANN, C.; BENEN, J.; PRETORIUS, I.S.; VIVIER, M.A. The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Research.* v. 15, p. 687-702, 2006.

JOUBERT, D. A.; DE LORENZO, G.; VIVIER, M. A. Regulation of the grapevine polygalacturonase-inhibiting protein encoding gene: expression pattern, induction profile and promoter analysis. *J. of plant res.*, p. 1-15, 2013.

KEMP, G.; STANTON, L.; BERGMANN, C.W.; CLAY, R.P.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. Polygalacturonase-inhibiting proteins can function as activators of polygalacturonase. *Mol Plant Microbe Interact* v.17, p. 888–894, 2004.

KESTER, H. C. M.; VISSER, J. Purification and characterization of polygalacturonase produced the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol Appl Bioch* v.12, p.150-160, 1990.

KOSAK, K.; JONES, J. D. G. Responses to Plant Pathogens. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Ed. American Society of Plant Physiologists.* p. 1102-1156, 2000.

LECKIE, F.; MATTEI, B.; CAPODICASA, C.; HEMMINGS, A.; NUSS, L.; ARACRI, B.; DE LORENZO, G.; CERVONE, F. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed α -strand/ α -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *EMBO J*, v.18, p. 2352–2363, 1999.

LI, R.; RIMMER, R.; YU, M.; SHARPE, A.G.; SEGUIN-SWARTZ, G.; LYDIATE, D.; HEGEDUS, D.D. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. *Planta* v.217, p. 299–308, 2003.

LIANG, F.S.; ZHANG, K.C.H.; ZHOU, C.H.J.; KONG, F.N.; LIA, J.; WANG, B. Cloning, characterization and expression of the gene encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) of peach [*Prunus persica* (L.) Batch]. *Plant Sci* v.168, p. 481–486, 2005.

LIBERATO, J.R.; COSTA, H. Incidência de antracnose e podridão peduncular em frutos de mamoeiro em Linhares - ES. *Fitopatologia Brasileira.* v. 22, p. 276,1997. (Resumo).

LIBERATO, J.R.; TATAGIBA, J.S. Avaliação de fungicidas in vitro e em pós-colheita para o controle de antracnose e da podridão em frutos de mamão. *Summa Phytopathol.* v. 27, p. 409-414, 2001.

LIU, D.; LI, W.; HE, X.; DING, Y.; CHEN, C.; GE F. Characterization and functional analysis of a novel PGIP gene from *Pyrus pyrifolia* Nakai cv Huobali *Acta Physiologiae Plantarum* v. 35, p. 1247-1256, 2013.

LORENZO, G.; FERRARI, S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol.* v. 5, p. 295- 299, 2002.

MARIN, S.L.D.; GOMES, J.A.; SALGADO, J.S. Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do ES. 4 ed. Vitória ES. Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, 57p. (EMCAPA, circular técnica 3), 1995.

MATTEI, B.; SALVI, G.; CAPRARI, C.; DE LORENZO, G.; CRESCENZI, V.; CERVONE, F. Analysis of the interaction between PGIP from *Phaseolus vulgaris* L. and fungal endopolygalacturonases using biosensor technology. *Progress in Biotechnology*, v.14, p. 775-782, 1996.

MEHLI, L.; SCHAART, J.G.; KJELSEN, T.D.; TRAN, D.H.; SALENTIEN, E.M.J.; SCHOUTEN, H.J. ; IVERSEN, T.H. A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry. *New Phytol.* v.163, p.99–110, 2004.

MFOLD disponível em (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>). Acessado em agosto 2010.

MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J. H.; ... & DELCHER, A. L. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, v. 452(7190), p. 991-996, 2008.

MISAS-VILLAMIL, J. C.; VAN DER HOORN, R. A. L. Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 11, p. 380-388, 2008.

NCBI disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acessado em: dezembro 2009.

NETPRIMER disponível em: (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) acessado em: julho 2010.

NITURE, S.K. Comparative biochemical and structural characteristics of fungal polygalacturonases. *Biologia.* v. 63, p.1–19, 2008.

NURNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, v.6, p.372-379, 2001.

OLIGO ANALYSIS TOOL disponível em: (<http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx>). Acessado em agosto 2010.

OLIVEIRA, A.A.R.; FILHO, H.P.S. Mamão em foco: Podridões pedunculares. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, BAHIA, Embrapa Mandioca e fruticultura, n. 2, 2004. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/docs/publicacoes/produto_em_foco/mamao_22.pdf Acesso em: 02/07/2009.

PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotech. letters* v.26, p.509-515, 2004.

PFAFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* v. 29, p. 2002-2007, 2001.

POWELL, A.L.T., VAN KAN, J., TEN HAVE, A., VISSER, J., GREVE, L.C., BENNETT, A.B., LABAVITCH, J.M. Transgenic Expression of Pear PGIP in Tomato Limits Fungal Colonization. *Mol. Plant Microbe In.* v.13, p.942-950, 2000.

PRIMER3 disponível em: (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) acessado em: julho 2010/ junho 2011.

RAMANATHAN, V., SIMPSON, C.G., THOW, G., IANETTA P.P.M., MCNICOL, R.J., WILLIAMSON, B. cDNA cloning and expression of polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) from red raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Exp. Bot.*, v.48, p.1185–1193, 1997.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L. The size of the substrate-binding site of an *Aspergillus niger* extracellular endopolygalacturonase. *Eur J Biochem.* v. 39, p.109–115, 1973.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem*, v.57, p. 929–967, 2001.

SALVI, G.; GIARRIZZO, F.; DE LORENZO, G.; CERVONE, F. A polygalacturonaseinhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. *J of Plant Physiol.* v. 136, p. 513–518, 1990.

SALZMAN, R.A., TIKHONOVA, I., BORDELON, B.P., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* v. 117, p. 465–472, 1998.

SAMBROOK, J., AND RUSSELL DAVID, W. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA Sequence with chain termination inhibitors. *P. Natl. Acad. Sci - Biol*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, K. T. dos. Atividade fotoquímica em folhas de plantas de mamoeiro durante o estágio reprodutivo e caracterização da ontogenia dos frutos. Dissertação de Mestrado Acadêmico. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo, 2007.

SCHAART, J.G.; MEHLI, L.; SCHOUTEN, H.J. Quantification of allele-specific expression of a gene encoding strawberry polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) using pyrosequencing. *Plant J* v. 41, p.493–500, 2005.

SCHMITTGEN, T.D., LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. v.3, p. 1101-1108, 2008.

SHAH, P.; POWELL, A.L.; ORLANDO, R.; BERGMANN, C.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G. Proteomic analysis of ripening tomato fruit infected by Botrytis cinerea. *J Proteome Res*, v. 11, p. 2178-92, 2012

SHI, J.; LIU, A.; LI, X.; FENG, S.; CHEN, W. Inhibitory mechanisms induced by the endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. *Biol Control*. v. 56, p. 2-8, 2011.

SHIGA, T. M. ; FABI, J. P. ; DO NASCIMENTO, J. R. O. ; PETKOWICZ, C. L. DE O. ; VRIESMANN, L. C. ; LAJOLO, F. M. ; CORDENUNSI, B. R. Changes in Cell Wall Composition Associated to the Softening of Ripening Papaya: Evidence of Extensive Solubilization of Large Molecular Mass Galactouronides. *J of Agr Food Chem*, v. 57, p. 7064-7071, 2009.

SICILIA, F.; FERNANDEZ-RECIO, J.; CAPRARI, C.; DE LORENZO, G.; TSENOGLOU, D.; CERVONE, F.; FEDERICI, L. The polygalacturonase-inhibiting protein PGIP2 of Phaseolus vulgaris has evolved a mixed mode of inhibition of endopolygalacturonase PG1 of Botrytis cinerea. *Plant Physiol* v.139, p.1380–1388, 2005.

SILVA, M.M; BROETTO, S.G.;FREIRE, S.C.V;COSTA, A.F.S.; SILVA, D.M. Características vegetativas e de frutos de mamoeiros obtidos por seleção massal. *Semina* v. 31,p. 29-38, 2010.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology* v.7, p.33, 2006

SIMPSON, C.G.; MACRAE, E.; GARDNER, R.C. Cloning of a polygalacturonase inhibiting protein from kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Plant Physiol.* v. 108, p.1748, 1995.

SPADONI, S.; ZABOTINA, O.; DI MATTEO, A.; MIKKELSEN, J.D.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G.; MATTEI, B.; BELLINCAMPI, D. Polygalacturonaseinhibiting protein interacts with pectin through a binding site formed by four clustered residues of arginine and lysine. *Plant Physiol* v.141, p.557–564, 2006.

STOTZ, H. U.; BISHOP, J. G.; BERGMANN, C. W.; KOCH, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; LABAVITCH, J. M. Identification of target amino acids that affect interactions of fungal polygalacturonases and their plant inhibitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* V.56, p.117-139, 2000.

STOTZ, H.U.; CONTOS, J.J.A.; POWELL, A.L.T.; BENNETT, A.B.; LABAVITCH, J.M. Structure and expression of na inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Mol Biol.* v.25, p. 607- 617, 1994.

STOTZ, H.U.; POWELL, A.L.T.; DAMON, S.E.; GREVE, L.C.; BENNETT, A.B.; LABAVITCH, J.M. Molecular characterisation of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett. *Plant Physiol.* v.102, p.133-138,1993.

TATAGIBA, J. S.; LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.186-192, 2002.

TAMURA, M.; GAO, M.; TAO, R.; LABAVITCH, J.M.; DANDEKAR, A.M. Transformation of persimmon with a pear fruit polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) gene. *Sci Hortic.* v. 130, p. 19–30, 2004.

TAYLOR, R.J.; SECCOR, G.A. An improved diffusion assay for quantifying the polygalacturonase content of *Erwinia* culture filtrates. *Phytopathology* v.78, p. 1101-1103, 1988.

TOUBART, P.; DESIDERIO, A.; SALVI, G.; CERVONE, F.; DARODA, L. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant J.* v. 2, p. 367–373, 1992.

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:RESEARCH0034.

VECSCREEN disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)
acessado em: setembro 2010.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. (2003) Manejo das doenças do mamoeiro In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (eds.) A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória - ES, p. 231-308.

WILLIAMSON, B., JOHNSTON, D.J., RAMANATHAN, V., MCNICOL, R.J. A polygalacturonase inhibitor from immature raspberry fruits: a possible new approach to grey mold control. *Acta Hort* v.352, p.601– 605, 1993.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques*, v.39, p.75–85, 2005.

YAO, C.; CONWAY, W.S.; SAMS, C.E. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from Apple fruit. *Phytopathology*. v.85, p. 1373-1377, 1995.

YAO, C.L.; CONWAY, W.S.; REN, R.H.; SMITH, D.; ROSS, G.S.; SAMS, C.E. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol Biol*. v. 39, p.1231–1241, 1999.

ZHANG,Y.; TANG,H.; HOU, Y.; JIANG, H.; LUO,Y.; ZHANG, J. Cloning, characterization, and expression of the gene encoding polygalacturonase- inhibiting proteins from strawberry. *Turk J Agric For* . v. 34, p. 393-399, 2010.

ZHU, X.; LI, X.; ZOU, Y.; CHEN, W.; LU, W. Cloning, characterization and expression analysis of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene in harvested papaya (*Carica papaya*) fruit under temperature stress. *Food Research International*. v. 49, p.272-279, 2012.

7 APÊNDICE

Tabela 6. Análise estatística pelo teste de Tukey para a expressão relativa da polpa e da casca de CpPGIP comparando-as em termos de amostragem biológica.

POLPA <i>Cppgip4</i>	30	60	90	110	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TEF	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
UBQ	**	NS	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*

CASCA <i>Cppgip4</i>	30	60	90	110	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TEF	*	**	**	**	NS	*	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS
UBQ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS

POLPA <i>Cppgip6</i>	30	60	90	110	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TEF	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	*	NS	*
UBQ	**	NS	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	*

CASCA <i>Cppgip6</i>	30	60	90	110	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TEF	*	**	**	**	NS	*	NS	NS	NS	*	**	NS	NS
UBQ	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	*	NS	NS	**	NS

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)**: significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)ns: não significativo ($p \geq 0,05$)**Tabela 7.** Análise estatística pelo teste de Tukey para a expressão absoluta da polpa e da casca de CpPGIP comparando-as em termos de amostragem biológica.

	30	60	90	110	1	2	3	4	5	6	7	8	9
POLPA <i>Cppgip4</i>	*	**	**	*	*	*	**	**	NS	NS	NS	NS	NS
POLPA <i>Cppgip6</i>	NS	NS	*	*	NS	*	NS	NS	*	*	**	NS	NS
CASCA <i>Cppgip4</i>	NS	NS	**	**	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
CASCA <i>Cppgip6</i>	**	**	*	*	NS	*	*	NS	*	*	*	**	**

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)**: significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)ns: não significativo ($p \geq 0,05$)

Tabela 8. Análise estatística pelo teste de Tukey para a expressão absoluta de CpPGIP dos outros tecidos comparando-os em termos de amostragem biológica.

	R1	R2	C1	C2	F1	F2	S1	S2	P1	P2	Cc 1	Cc 2
<i>Cppgip4</i> (n° de cópias/ mg de tecido)	*	*	*	**	*	**	*	*	NS	*	*	**
<i>Cppgip6</i> (n° de cópias/ mg de tecido)	*	**	*	NS	*	**	*	NS	**	**	**	*
<i>Cppgip4</i> (n° de cópias/ µg de RNA)	NS	NS	NS	NS	*	*	**	*	*	**	NS	*
<i>Cppgip6</i> (n° de cópias/ µg de RNA)	NS	NS	NS	*	*	NS	*	**	*	**	*	**

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

**: significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

ns: não significativo ($p \geq 0,05$)

Optimized	7	GAAC TTT GTAATACTGAAGACAAGAGG TTT TGCTTAAATCAAGAAGGCATTGCATAAT
Original	7	GAGCTCTGCAACACAGAAGACAAAAAGTCCTCCTCAAGATCAAGAAAGCCCTACACAAC
Optimized	67	CCATATCAT TTT GGTTTCC TGGG ACCCTAAGACTGATTGTTGCACATGGTACTGTGTTCAT
Original	67	CCTTACCACCTTGTCTCATGGGATCCTAAAAACAGACTGCTGTACCTGGTACTGCGTCCAT
Optimized	127	TGCCACGATACTACACATAGAATTGACCAATTGAACATCTTTTCCGGTGACATTAATGGA
Original	127	TGTCATGACACCACCCACCGGATCGACCAGCTAAATATATTCTCCGGCGATATCAACGGC
Optimized	187	CAGATCCCACCTGAAGTTGGAGATT TGCC ATTTCTTGACTATTTGGTCTTCAGAAAGCTT
Original	187	CAAAATCCCGCCGGAAGTCGGTGACCTTCCCTTCCTCGATTATCTAGTCTTCCGCAAACTC
Optimized	247	ACA AA TTTGACCGGA ACT ATTTCCACCTACCATCGCC AA GGCTTAA AA ACTTTGGTTAGTTTG
Original	247	ACAAACCTCACCGGCACTATACCACCCACCATAGCCAAACTCAAGAACCTCGTCTCCCTC
Optimized	307	ACCCTTTCTTGG ACT GATTTGAGTGGTCCAGTCCCTGGATTTCTTTCTCAATTGAAGAAC
Original	307	ACCCTCAGCTGGACAGACCTCTCTGGCCCAGTTCAGGCTTTCTCAGCCAGCTCAAGAAC
Optimized	367	CTTGATTACTTGACCTTCTTTTAACAAGTTGTCAGGTACTATTCCATCTTCCTTTTCA
Original	367	CTAGACTACTTGGATCTTTCTTTTAACAAACTCTCCGGCACCATACCTAGCTCCTTCTCT
Optimized	427	AGTTTCCCTAAGTTGAGAACTTTGCATCTTGATAGAAACAAGTTGACAGGATCTATCCCA
Original	427	TCCTTCCCAAGCTTCGCACCTTCACTTGGACAGAAACAAGCTTACCGGGTCGATACCG
Optimized	487	GAAAGTTTGGTTCTTTTCAGAGGAGAGGTTCTGACTTGTTTCTTAGTCACAACCAATTG
Original	487	GAGTCTTTCGGATCCTTTCGCGGGGAAGTACCCGACTTGTCTTGTCTCCACAACCAAGCTC
Optimized	547	GCAGGTAAACTTCCAGTCTCTTTGGGAAAAATGCAGTTTAGAACTATCGATCTTTCTCTGG
Original	547	GCTGGTAAGCTTCCAGTCTCGCTAGGGAAAAATGCAGTTTAGAACTATTGATTGTCTGTGG
Optimized	607	AACAGATTGCAAGGTGACGCTTCAATGTTGTTCAATACACAGACCATGGTTATTATCTTG
Original	607	AACAGGCTTCAGGGTGACGCGTCCATGTTGTTTAACACGCAACCATGGTGATTATCTTG
Optimized	667	TCCAGAAACTCAATTTGAGTTTCGATTTGAGTAAGGTTAAACTTCCAAGATCTTTGGTCTGG
Original	667	TCGAGGAACCTCTTTTGAGTTTGATCTTTGAAAGTGAAGTTACCCAGAAGCTTGGTGTGG
Optimized	727	TTGGACCTTTCCCATATAAGAAATTAGAGGTTCACCTCCTGCTGGATTGGCCAGATTGCAA
Original	727	CTGGATCTGAGCCACAACAGAATCAGAGGTAGCTTACCGGCAGGGTTGGCCCGGCTTCAG
Optimized	787	CTTCAGTTCTTGAACGTTTCTTACAATTTCTTGTTGGTAAATCCCTGATGGTGAAGAG
Original	787	TTGCAGTTCCTGAACGTAAGCTATAACTTTCTGTGTGGGAAGATCCCGGACGGCGAAGAG
Optimized	847	TTGGGAAGATTGACTCTTCTCATATTTCCACAACAGATGTCTTGCAGGAGCTCCATTG
Original	847	CTGGGGAGGTTGATTTCGTCTCTTACTTTTCATAACCGGTGCCTGTGCGGTGCCCTCTG
Optimized	907	CAACCTTGTAAGTTGAAA
Original	907	CAACCATGCAAGCTGAAG

Figura 26. Alinhamento entre a sequência original descrita para *Cppgip4* e a sequência sintetizada pela empresa GenScript, na qual constam modificações nucleotídicas para a otimização da expressão no sistema heterólogo *P. pastoris* mantendo-se a sequência original de aminoácidos do polipeptídeo gerado e contendo os sítios de restrição para KpnI e NotI.

Optimized	7	GATAGATGTAACCTGAAGATAAGAAGGTCCTTTTGAAGATCAAGAAAGCATTGCACAAC
Original	7	GACCGCTGCAACCCAGAAGACAAAAAAGTTCTCCTCAAGATAAAAAAAGCACTACACAAT
Optimized	67	CCATACCATTGGCCCTCGGAACCTGAAAGTTGACTGTTGCATTGGTACTCTTTGAAG
Original	67	CCTTACCACCTTGCCCTCATGGAACCCAGAAGTCGACTGCTGCATATGGTACTCACTCAA
Optimized	127	TGTTCCAGAACTACAACAGAGTCTACAAGTTGACTATCTTCGCAGGTCAAATTAATGGA
Original	127	TGCAGCCGCACCACCAACCGAGTATATAAACTCACCATCTTCGCCGGCCAGATCAACGGT
Optimized	187	CAGATCCAGCTGAAAGTTGGAGATTGCTCTTTCTTGAGACCTTGATGTTCCATAAGTTG
Original	187	CAAATCCCGGCCGAAGTCGGCGACCTTCCTTCCTCGAAACCTAATGTTCCACAACTA
Optimized	247	ACCAACATTACTGGACCAGTCCAACTGCTATCGCCAAGCTTACTAACTTGAAATACCTG
Original	247	ACCAACATCACTGGCCAGTCCAACCCGCCATTGCCAACTCACCACCTCAAGTACCTT
Optimized	307	GATCTTTCCTGGAATCACTTGTGAGTCCAGTTCCTGACTTTCTTTCCCAATTGAAAAAC
Original	307	GATCTTAGCTGGAATCATCTCTCCGGCCAGTTCCTGACTTTCTCAGCCAGCTCAAGAAC
Optimized	367	CTTATTTCTTGGATCTTTCATTCGAATCAGTTGTGAGGAAGTATCCCATCTTCTCTGAGT
Original	367	CTAATCTTCTTGGATCTTTCATTTAATCAACTCTCTGGGTCTATCCCAAGCTCGCTCTCC
Optimized	427	ACACTTCCTAACTTGACCTCTATCAGACTTGATAGAAACAATTGACTGGTCAGATCCCA
Original	427	ACCCTTCCAAACCTTACATCCATCCGCCTGGACAGAAACAATCTCACCGGTCAAATACCG
Optimized	487	ATGTCATTTGGTAGTTTCGCTGGAGAGTTCCTTATTTGATCCTTAGTCATAATAAGTTG
Original	487	ATGTCCTTCGGTTCCTTCGCCGGAGAATTTCCATACTTAATCCTGTCTCACAACAAGCTT
Optimized	547	TCTGGTTCCATCCCAGCCTCTTTGGGTAAAAAGGATTTTGGAACCTGGACCTTTCCAGA
Original	547	TCCGGCAGCATACCGGCATCATTTGGGTAAAAAGGACTTCGGCAACCTTGATTTGTCGAGG
Optimized	607	AATAGATTGGAAGGAGACGCTAGTATGGTTTCAACTCTAAGACTAGATGGATCATTG
Original	607	AACAGGCTCGAAGGCGATGCGTCGATGGTGTCAACTCCAAAACCAGGTGGATTGATCTG
Optimized	667	TCTAGAAATTTGCTTGAGTTCGACTTCTCCAAGGTCGAACCTTCAGAGAACTTGACTTGG
Original	667	TCGAGGAACTTATTGGAGTTTGATTTTTCGAAAGTGGAGTTGTGCGAGAACTTAACATGG
Optimized	727	TTGGATCTTAACCATAACAAGATTACAGGTTCAATGCCAGAAAGTCTATCGTTTCTCTT
Original	727	TTGGATCTGAACCATAACAAGATTACAGGGAGTCTGCCGGAGTCAGCGATTGTAAGCTTG
Optimized	787	CAATTCTTGAACGTCTCTTACAATAGATTGTGTGGAGAGATTCCTGTTGGTGGAGATTG
Original	787	CAGTTCTTGAATGTGAGCTACAACAGACTGTGTGGAGAGATCCAGTCGGCGGCATTGA
Optimized	847	CAGAGATTGACTTACACTGCCTATTTCCACAATAGATGCTTTGCGGTGCACCTTTGCCA
Original	847	CAGAGGTTTCGATTACACTGCGTATTTTCACAATCGGTGCTTGTGCGGTGCTCCTCTCCG
Optimized	907	CCTTGCAAG
Original	907	CCCTGCAAG

Figura 27. Alinhamento entre a sequência original descrita para *Cppgip6* e a sequência sintetizada pela empresa GenScript, na qual constam modificações nucleotídicas para a otimização da expressão no sistema heterólogo *P. pastoris* mantendo-se a sequência original de aminoácidos do polipeptídeo gerado e contendo os sítios de restrição para KpnI e NotI.