



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO EM SISTEMA
BACTERIANO DE UM GENE QUE CODIFICA UMA PROTEÍNA
TRANSPORTADORA DE LIPÍDEOS DE *PIPER NIGRUM***

WENDELL UPTON DE BRITO

BELÉM-PA
Maio – 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO EM SISTEMA
BACTERIANO DE UM GENE QUE CODIFICA UMA PROTEÍNA
TRANSPORTADORA DE LIPÍDEOS DE *PIPER NIGRUM***

WENDELL UPTON DE BRITO

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Regina Batista de Souza

BELÉM-PA
Maior – 2012

Brito, Wendell Upton

Isolamento, caracterização e expressão em sistema bacteriano de um gene que codifica uma proteína transportadora de lipídeos de *piper nigrum* / Wendell Upton Brito–2012.

orientadora: Cláudia Regina Batista de Souza

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, 2012.

1. Piperacea. 2. Pimenta do reino – Doenças e pragas. I.Título.

CDD 22. ed.: 583.925



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO EM SISTEMA
BACTERIANO DE UM GENE QUE CODIFICA UMA PROTEÍNA
TRANSPORTADORA DE LIPÍDEOS DE *PIPER NIGRUM***

WENDELL UPTON DE BRITO

BANCA EXAMINADORA:

Prof. ^a. Dr.^a Cláudia Regina Batista de Souza
(ICB/UFPA-Orientadora)

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
(ICB/UFPA-Membro)

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
(ICB/UFPA-Membro)

Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo
(ICB/UFPA-Suplente)

BELÉM-PA
Maio - 2012

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS



Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior



Universidade Federal do Pará-UFPA



**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará
- FAPESPA**



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq



Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular - PNBC

Agradecimentos

À Universidade Federal do Pará.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular e todos os professores.

À Professora Dr.^a Cláudia Regina Batista de Souza, pela orientação e incentivo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao CNPq e FAPESPA pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Molecular.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular.

Aos professores da Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Ao Grupo de Biologia Molecular Vegetal.

Aos amigos Aline Medeiros, Liliane Tavares, Sávio Reis, Cristina Michiko, Ailton Borges, Elaine Pessoa, Mariana Araújo, Wallax Augusto.

Ao meus familiares, Socorro Upton, Aldelino Brito, Anderson Upton, Abigail de Jesus Upton (*in memoriam*) e Flora Upton, Cláudia Upton e a Carol Upton.

À minha esposa Valéria Risuenho Marques.

Ao meu filho Gustavo Risuenho Upton.

Todos os homens, por natureza, desejam
o conhecimento.

Aristóteles

RESUMO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) constitui uma das espécies de pimenta mais amplamente utilizadas no mundo, pertencendo à família Piperaceae, a qual compreende cerca de 1400 espécies distribuídas principalmente no continente americano e sudeste da Ásia, onde esta cultura originou. A pimenteira-do-reino foi introduzida no Brasil no século XVII, e tornou-se uma cultura de importância econômica desde 1933. O Estado do Pará é o principal produtor brasileiro de pimenta-do-reino, contudo sua produção vem sendo afetada pela doença fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Estudos prévios revelaram a identificação de sequências de cDNA diferencialmente expressas durante a interação da pimenteira-do-reino com o *F. solani* f. sp. *piperis*. Entre elas, uma sequência de cDNA parcial que codifica para uma proteína transportadora de lipídeos (LTP), a qual é conhecida por seu importante papel na defesa de plantas contra patógenos e insetos. Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi isolar e caracterizar as sequências de cDNA e genômica de uma LTP de pimenteira-do-reino, denominada PnLTP. O cDNA completo da PnLTP isolado por meio de experimentos de RACE apresentou 621 bp com 32 pb and 235 bp nas regiões não traduzidas 5' e 3', respectivamente. Este cDNA contém uma ORF de 354 bp codificando uma proteína deduzida de 117 resíduos de aminoácidos que apresentou alta identidade com LTPs de outras espécies vegetais. Análises das sequências revelou que a PnLTP contém um potencial peptídico sinal na extremidade amino-terminal e oito resíduos de cisteína preditos por formar quatro pontes de dissulfeto, as quais poderiam contribuir para a estabilidade desta proteína. O alinhamento entre as sequências de cDNA e genômica revelou a ausência de introns na região codificante do gene PnLTP, o que está de acordo ao encontrado em outros genes de LTPs de plantas. Por último, a PnLTP madura foi expressa em sistema bacteriano. Experimentos adicionais serão realizados com o objetivo de avaliar a habilidade da PnLTP recombinante em inibir o crescimento do *F. solani* f. sp. *piperis*.

Palavras-chave: LTP, cDNA, defesa de plantas.

ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum* L.) is one of the most widely used spices in the world belonging to the Piperaceae family, which comprises about 1400 species distributed mainly in the American tropics and Southern Asia, where this crop originated. Black pepper was introduced in Brazil in the 17th century and has been a nationally important crop since 1933. The Pará State is the main Brazilian producer of black pepper; however, the spice's production has been damaged by the root rot disease caused by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Previous studies have revealed the identification of some cDNA sequences differentially expressed during compatible black pepper - *F. solani* f. sp. *piperis* interaction. Among them, a partial cDNA sequence coding for a putative Lipid transfer protein (LTP), which is known to play important roles in plant defense against insects and pathogens. Therefore, the aim of this work was to isolate and characterize the full-length cDNA and genomic sequences of black pepper LTP, named PnLTP. The PnLTP full-length cDNA isolated by RACE assays showed 621 bp with 32 bp and 235 bp non-coding sequences at the 5' and 3' ends, respectively. This cDNA contains a 354-bp ORF coding for a deduced protein with 117 amino acid residues that showed high identity with LTPs from different crops. Sequence analysis revealed that PnLTP contains a putative peptide signal at amino-terminal and eight cysteine residues predicted to form four disulfide bridges, which could contribute to protein stability. Alignment between genomic and cDNA sequences revealed no introns within PnLTP coding region, that is in accordance with other LTP plant genes. Finally, the mature PnLTP was expressed in bacteria system. Additional experiments will be performed in order to evaluate the ability of recombinant PnLTP in inhibit the *F. solani* f. sp. *piperis* growth.

Keywords: LTP, cDNA, plant defense.

Lista	de	figuras:
Figura 1: Pimenteira-do-reino em fase reprodutiva.		15
Figura 2: Pimenteira infectada pelo <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>		18
Figura 3: Modelo gene-a-gene da interação planta-patógeno, segundo a teoria proposta por Flor (1955). Fonte: Buchanan et al. (2000).....		21
Figura 4: Modelo proposto para LTPs trocarem lipídios entre membranas. 1 proteína transportadora de lipídeo capaz de formar complexos reversíveis em fosfolipídeos; 2 e 3 permitindo a troca dos fosfolipídeos ligados entre membranas. Adaptada de Kader (1997).....		25
Figura 5: Mapa do vetor de expressão pET29a (Novagen, USA).....		38
Figura 6: Seqüência de aminoácidos deduzida da PnLTP.....		40
Figura 7: Alinhamento da PnLTP com seqüências de LTPs do GenBank. Em vermelho o peptídeo sinal enquanto as setas indicam os resíduos de cisteínas conservados.....		42
Figura 8: Predição das pontes dissulfeto na seqüência da PnLTP.....		43
Figura 9: Seqüência de aminoácidos da PnLTP, com a identificação das cisteínas, peptídeo sinal e domínio conservado e a estrutura secundária com a identificação das alfa-hélices.....		44
Figura 10: Estrutura tridimensional do DIR1 com a cavidade hidrofóbica e as cinco hélices (H1 a H5), de acordo com o relatado por Lascombe et al. (2008).....		45
Figura 11: Amostras de DNA das construções pET29a-PnLTP1 (1) e pET29a-PnLTP2 (2) digeridas com as enzimas <i>Nde</i> I e <i>Xho</i> I analisadas em gel de agarose corado com brometo de etídeo. M: marcador 1 kb plus DNA ladder.....		46
Figura 12: Análise eletroforética (SDS -PAGE) da PnLTP induzida e não induzida...		47

Lista de tabelas:

Tabela 1: Classificação das proteínas PRs, de acordo com suas propriedades e mecanismo de ação.24

Tabela 2: Análise comparativa da sequência da PnLTP com sequências depositadas no GenBank do NCBI.40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Família Piperaceae	14
1.2 Histórico da pimenteira-do-reino no Brasil.....	16
1.3 Mecanismo de defesas de plantas	19
1.4 Interação planta patógeno	20
1.5 Proteínas PRs	22
1.6 Proteínas transportadoras de lipídeos	24
1.7 Classificação das LTPs	26
1.8 Atividade biológica das LTPs.....	27
1.9 Distribuição e localização das LTPs	29
1.10 LTP em pimenteira-do-reino	29
2. OBJETIVOS.	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 RNA total da raiz de pimenteira	32
3.2 Extração de DNA genômico de pimenteira.....	32
3.3 Desenho dos iniciadores	33
3.4 Amplificação das extremidades 5'e 3'do cDNA da PnLTP	33
3.5 Amplificação de fragmentos correspondentes a ORF da PnLTP por meio de PCR34	
3.6 Purificação dos fragmentos	35
3.7 Clonagem dos fragmentos	35
3.8 Seqüenciamento	36
3.9 Análises computacionais	36
3.10 Produção da proteína recombinante PnLTP	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Obtenção do cDNA completo de PnLTP.....	40
4.2 Obtenção da seqüência genômica da PnLTP	41
4.3 Análise da seqüência de aminoácidos	41
4.4 Clonagem da PnLTP no vetor de expressão pET29a.....	45
4.5 Produção da proteína PnLTP em bactéria.....	45
5. CONCLUSÕES	47

REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A – Tabela de aminoácidos	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Piperaceae

As plantas da família Piperaceae são angiospermas que apresentam seu corpo vegetativo diferenciado em raiz, caule e folha. As Angiospermas estão divididas em duas classes: monocotiledônea e dicotiledônea. As plantas dessa família são dicotiledôneas e estão classificadas neste trabalho seguindo a linha filogenética de Arthur Cronquist. Em 1968, Arthur Cronquist propôs a classificação das Magnoliophytas baseando-se em Armen Takhtajan, considerando diversos aspectos morfo-fisiológicos. Divisão Magnoliophyta; classe Magnoliopsida; subclasse Magnoliidae; ordem Piperales e família Piperaceae (AGAREZ, 1994).

Essa família apresenta distribuição pantropical com centro de diversidade localizado nas Américas Central e do Sul (YUNCKER 1958, JARAMILLO & MANOS 2001, MEDEIROS & GUIMARÃES 2007). É composta por cerca de dez gêneros, cujos principais são: Lepianthes, Sarcorrhachis, Ottonia, Pothomorphe, Peperomia e Piper. Destes, os maiores gêneros são os dois últimos citados, contendo cerca de mil espécies cada um. O gênero Peperomia é caracterizado em sua morfologia, principalmente, como plantas pequenas, suculentas, muitas vezes epífitas, enquanto que o gênero Piper é composto por plantas lenhosas, incluindo arbustos, trepadeiras e pequenas árvores (DYER *et al.*, 2004).

O gênero Piper inclui grande número de espécies que se caracterizam pelo uso medicinal popular e pela importância econômica e comercial, em virtude da produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, farmacêutica e também de inseticidas (SILVA & MACHADO, 1999). Esse gênero abrange uma das mais relevantes e antigas especiarias, a pimenta, comercializada em Malabar, uma região na costa oeste do sul Índia, e distribuída para diversos países. Dentre as espécies do gênero Piper, a pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a que mais se destaca, em virtude de sua importância econômica, apresentando tanto variedades selvagens quanto cultivadas (DASGUPA & DATTA, 1976). O centro de origem desta espécie está localizado, presumivelmente, nas florestas do Sudeste da Índia, Western Gaths, Malabar, de onde se espalhou, inicialmente, para o Sudeste da Ásia por meio de estacas, sendo muito posteriormente introduzidas na África, ilhas do Pacífico e Américas do Sul e Central (GENTRY, 1955; ZEVEN, 1974).

No Brasil esta família está representada por aproximadamente 500 espécies

(YUNCKER, 1966,1972, 1973, 1974) distribuídas em cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis*. (TEBBS 1989, JARAMILLO & MANOS 2001, ARIAS *et al.* 2006). Dentre esses gêneros o que mais se destaca no Brasil é o gênero *Piper*, tendo como maior representante a pimenteira-do-reino (Figura1), devido apresentar grande valor econômico. Esta é uma espécie perene, arbustiva, trepadeira, apresentando inflorescência em forma de espiga, chamada amentilho, e é composta de pequenas flores desprovidas de cálice e corola, os frutos são globosos, pequenos e indeiscentes, apresentando cor verde-escuro quando imaturos e coloração vermelha quando maduros (GARCIA *et al.*, 2000).

A comercialização da pimenta-do-reino pode ser realizada na forma de pimenta preta, branca, verde, além de óleo essencial e oleorresina, extraídos dos grãos para utilização nas indústrias de alimentos e cosméticos (STEIN *et. al*, 1995).



Figura 1: Pimenteira-do-reino em fase reprodutiva.

Fonte: Nascimento, 2009.

1.2 Histórico da pimenteira-do-reino no Brasil

A pimenteira-do-reino foi introduzida no Brasil no século XVII pelos portugueses. Inicialmente teve a sua distribuição restrita ao litoral, no estado da Bahia, e posteriormente foi levada para os estados da Paraíba, Maranhão e Pará, cuja produção era incipiente (ALBUQUERQUE & CONDURU, 1971). No século XX a pimenteira-do-reino foi reintroduzida no Brasil, no estado do Pará, por imigrantes japoneses no ano de 1933; quando trouxeram do porto de Cingapura 20 mudas do cultivar *Kuching* que no Brasil foi registrada como Cingapura-BRA-019, e cultivada no Município Paraense de Tomé-Açu, onde teve início a produção comercial, principalmente da pimenta preta e pimenta branca. Essa cultura se adaptou muito bem ao clima quente e úmido da região, com precipitação pluviométrica média de 2.500 mm/ano, umidade acima de 80% e temperatura média em torno de 23°C a 28°C, e ao solo com boa drenagem, condições típicas da região norte do Brasil (ALBUQUERQUE *et al.*, 1989).

A pimenteira-do-reino pode ser propagada por sementes e por estacas (propagação vegetativa). Quando a propagação ocorre por sementes, as plantas começam a produzir no sétimo ano, enquanto que as oriundas de estacas começam a produzir no terceiro ano. Plantas provenientes de estacas mantêm as mesmas características genéticas da planta mãe, com isso havendo uma diminuição da variabilidade genética. Visando à produção em escala comercial, a disseminação da pimenteira-do-reino se deu através da propagação vegetativa (CASTRO, 1979; DUARTE, 1999). Atualmente a propagação por estacas é feita, na maioria das vezes, por estacas herbáceas, devido apresentarem vantagens em relação às estacas semilenhosas que prejudicam as plantas e transmitem doenças (CHU *et al.*, 2006).

No cenário mundial por volta de 1950, após a Segunda Guerra Mundial, grandes plantações de pimenta-do-reino foram destruídas no oriente, ocasionando, com isso, uma diminuição da produção e conseqüentemente uma elevação do preço desta especiaria, fazendo com que a tonelada da pimenta preta e pimenta branca atingisse 5 mil e 7 mil dólares respectivamente (OKAGIMA, 1997). Essa alta de preço e a boa produtividade do cultivar Cingapura, no Brasil, proporcionaram a ampliação da área plantada no estado do Pará. Desse modo, o Brasil além de se tornar auto suficiente na produção da pimenta-do-reino, também se tornou um país exportador desta especiaria. Nessas condições, a pimenta-do-reino passou a ser um

dos principais produtos das exportações paraenses (BARBOSA, 1998).

Em 1957, tem-se os primeiros relatos de uma doença que atacava as plantas de pimenteira-do-reino, deixando as folhas secas, sistema radicular comprometido e redução da vida útil dos pimentais de 15 anos para 4 à 6 anos. A natureza do agente causador dessa doença foi identificado em 1959 como sendo: fungo biotrófico de solo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (teleomórfico: *Nectria heamatococca* f. sp. *piperis*) causador da doença denominada fusariose (Figura 2) (ALBUQUERQUE & FERRAZ, 1976; ALBUQUERQUE & DUARTE, 1991; HAMADA *et al.*, 1988; ALBUQUERQUE *et al.*, 2001).

Apesar de grande parte dos pimentais na década de 70 ter sido comprometida com Fusariose, em 1982 o Brasil foi o maior produtor e exportador mundial de pimenta-do-reino com 50 mil e 47 mil toneladas respectivamente (FILGUEIRAS *et al.* 2002).

No Brasil a produção de pimenta-do-reino esta concentrada nos estados do: Pará, Maranhão, Paraíba, Bahia e Espírito Santo, sendo o estado do Pará o maior responsável pela produção nacional contribuindo com aproximadamente 80%. Na safra de 2011 o Pará produziu 44.157 toneladas de pimenta-do-reino, o que corresponde a 79,3% da produção nacional (IBGE, 2012).

A fusariose é a principal doença que compromete o cultivo da pimenta-do-reino e é de ocorrência restrita do Brasil. Após a identificação do agente causador dessa doença várias medidas têm sido adotadas para tentar controlá-la. Dentre elas: adubação química balanceada, drenagem do solo muito argiloso, irrigação no período de seca. Estas ações deixam a planta menos predisposta à doença. Tem-se também o controle químico com a utilização de fungicidas e o controle biológico que utiliza micro-organismos. Todas essas formas de controle da fusariose têm se mostrado pouco eficientes e muito onerosas. O desenvolvimento de cultivares resistentes através do melhoramento genético clássico, também não tem obtido muito sucesso, haja vista a estreita variabilidade genética da pimenteira-do-reino e o fato do patógeno ser endêmico do Brasil, não existindo no país de origem da pimenteira-do-reino. (DUARTE *et al.*, 2002; BENCHIMOL *et al.*, 2000).

Diante deste contexto, pesquisadores da EMBRAPA Amazônia Oriental (Belém-PA) identificaram algumas espécies da família piperáceas nativas da Amazônia resistentes a infecção pelo patógeno, entre elas a *Piper tuberculatum* Jacq.(ALBUQUERQUE *et al.*,2001).



Figura 2: Pimenteira infectada pelo *F. solani* f. sp. *piperis*.

Fonte: Nascimento, 2009.

Ainda hoje, passados mais de 50 anos da identificação do agente causador da fusariose, pouco se conhece da interação entre as plantas de pimenta e o fungo *F. solani* f. sp. *piperis*. Esta carência de conhecimento tem dificultado o melhoramento genético da cultura através de ferramentas biotecnológicas. O primeiro estudo molecular da resistência a fusariose foi realizado por Nascimento *et al.* (2009b) que identificou através de hibridização subtrativa por supressão (HSS), clones diferencialmente expressos durante a interação de *P. tuberculatum* e o *F. solani* f. sp. *piperis*. Dentre esses clones, pelo menos duas sequências estão potencialmente relacionadas com o mecanismo de defesa de plantas, tais como: peroxidase e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Com base nas funções descritas na literatura é possível que essas proteínas estejam envolvidas no mecanismo de resistência à fusariose através da produção reativas de oxigênio e/ou formação de barreiras estruturais em *P. tuberculatum* (NASCIMENTO *et al.* 2009b). Posteriormente, de Souza *et al.* (2011) também utilizaram a HSS na identificação de genes induzidos durante a interação da pimenteira-do-reino e este patógeno, entre eles, genes que codificam proteínas com função conhecida em mecanismos de defesa de plantas.

1.3 Mecanismos de defesas de plantas

As plantas são freqüentemente expostas a condições ambientais desfavoráveis como temperaturas elevadas, estresse hídrico, estresse salino, poluição e patógenos, que afetam o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade. Para sobreviverem, as plantas desenvolveram uma complexa rede de sinalização que as protege de condições ambientais adversas (KOVTON *et al.*, 2000). Uma das formas mais severas de estresses é a infecção por patógenos como bactérias, vírus e fungos, uma vez que as plantas não possuem células especializadas e um sistema imune como o dos animais. Contudo, os vegetais ao longo do processo evolutivo desenvolveram, mecanismos capazes de promover a sobrevivência, proteção contra infecções e ataques contra patógenos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; MALECK & DIETRICH, 1999; VALUEVA & MOSOLOV, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Para se protegerem contra a invasão de patógenos, as plantas utilizam mecanismos de defesa pré- existentes ou constitutivos, assim como mecanismos de defesa induzíveis. As defesas constitutivas são o primeiro obstáculo encontrado pelo patógeno ao tentar invadir a planta. O citoesqueleto fornece uma barreira física contra a maioria dos micro-organismos invasores, e os microfilamentos de actina desempenham um papel importante na defesa contra a penetração fúngica (MYSORE & RUY, 2004).

Os mecanismos de defesa induzível são o segundo obstáculo enfrentado pelo patógeno ao tentar invadir a planta; a infecção por fitopatógenos frequentemente conduz a uma resposta de defesa da planta por meio de mecanismos de eficiência variável (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Um dos mecanismos mais eficientes, no que diz respeito à resistência da planta, é a reação de hipersensibilidade (*Hypersensitive Response*- HR), em que há a produção de compostos antimicrobianos (fitoalexinas e enzimas hidrolíticas), e a indução de proteínas relacionadas à patogênese (*Pathogenesis Related* ou PR) produzidas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos.

A resistência é determinada por esta combinação de mecanismos de defesa constitutivos e induzível que envolve um grande número de proteínas e outras moléculas orgânicas produzidas antes e/ou durante o ataque do patógeno (FERREIRA *at al.* 2007). São estes vários mecanismos que fazem da doença uma

exceção e não a regra (REIGNAULT & SANCHOLLE, 2005).

1.4 Interação planta-patógeno

A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em interação compatível, quando o patógeno é capaz de provocar a doença e interação incompatível quando o patógeno não consegue se estabelecer na planta em virtude da mesma ser resistente (CORDEIRO & SÁ, 1999).

Do ponto de vista molecular os patógenos são classificados em: virulentos e avirulentos. Os virulentos não possuem o gene *avr*, cujo produto gênico é reconhecido por uma proteína de resistência (R) da planta. Com isso, o patógeno consegue provocar a doença. Já os avirulentos possuem o gene *avr*, sendo assim reconhecido por uma proteína de resistência (R) da planta. Na teoria gene-a-gene propostas por Flor (1971): para cada gene que condiciona uma reação de resistência R no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona avirulência (*Avr*). Dessa forma, proteínas R específicas da planta interagem com proteínas específicas de avirulência (*Avr*) do patógeno para causar resistência (Figura 3). Os genes *Avr* são assim chamados, em virtude de causarem avirulência na presença de genes R (BENT & MACKEY, 2007).

Com isso, a diferença básica entre interação compatível e incompatível está relacionada à presença ou à ausência de um gene de resistência (R) na planta e de um gene de avirulência (*avr*) no patógeno (BORÉM & MIRANDA, 2009; CORDEIRO & SÁ, 1999).

O reconhecimento de proteínas de avirulência *Avr*, denominado elicitor, por proteínas R, dispara vias de transdução de sinais, levando a ativação de um elaborado mecanismo de resistência com respostas locais e sistêmicas. Havendo o reconhecimento específico pela planta, uma resposta rápida e forte é desencadeado no local da infecção. Essa resposta é denominada de reação de hipersensibilidade (HR) e é característica das interações incompatíveis (ELVIRA *et al.*, 2008).

A HR é caracterizada pela rápida morte programada das células no local da infecção. Inicialmente, tem-se uma lesão denominada clorose localizada, que após 24 horas de infecção, progride para uma lesão necrótica. Esta por sua vez atua contra patógenos biotróficos, restringindo o acesso à água e a nutrientes, podendo ser ativada pelo ácido salicílico. A HR também está associada com um conjunto

integrado de alterações metabólicas que tem papel importante na medida em que impede a entrada de outros patógenos e limita as infecções subsequentes. A ativação de diversas vias de transdução de sinais resulta na expressão de vários genes de defesa (GLAZEBROOK, 2005; LEE; LEON; RASKIN, 1995; DURRANT; DONG, 2004; VAN LOON & VAN STRIEN, 1999; ELVIRA et al., 2008).

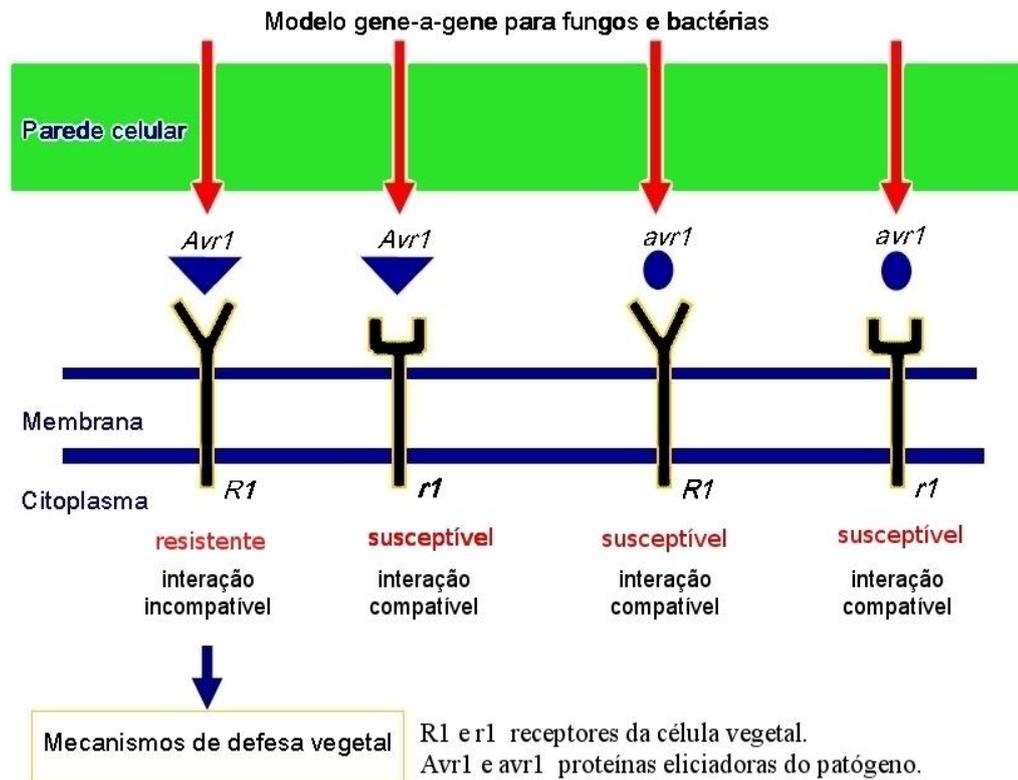


Figura 3: Modelo gene-a-gene da interação planta-patógeno, segundo a teoria proposta por Flor (1955). Fonte: Buchanan *et al.* (2000).

A transdução de sinais ocorre por uma complexa rede mediada, principalmente, por três moléculas sinalizadoras, ácido salicílico, etileno e o ácido jasmônico (CLARKE *et al.*, 2000; TON *et al.*, 2002; NIMCHUK *et al.*, 2003;), sendo o AS a principal molécula sinalizadora, em virtude de ser capaz de inibir a enzima catalase, responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em $H_2O + O_2$. Dessa forma ocorre um acúmulo desse composto. Este processo, de transdução de sinais, tem início pela alteração no fluxo de íons através da membrana plasmática seguido por um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species - ROS*) tal como radicais superóxidos (O_2^-) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2). Estas

espécies reativas de oxigênio interagem com o óxido nítrico podendo provocar a morte celular no sítio de infecção (McDOWELL & DANGL, 2000).

Após a HR a planta apresenta um aumento da resistência em locais distantes da infecção e proteção contra uma grande variedade de espécies de patógenos. O fenômeno, chamado de resistência sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance* – SAR) desenvolve-se após um período de vários dias depois da infecção inicial (RYALS, 1996). Ao nível molecular, a SAR se caracteriza pelo aumento na expressão de um grande número de proteínas PRs. Essas proteínas apresentam atividade antimicrobiana (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999) e ainda não se conhece a função de todas elas, mas acredita-se que a SAR é resultado de um efeito conjunto de várias proteínas PRs cuja expressão é disparada pelo aumento da concentração de ácido salicílico (STICHER *et al.*, 1997; DURRANT & DONG, 2004).

1.5 Proteínas PRs

As proteínas PRs são proteínas de defesa de plantas que são induzidas após infecções por agentes patogênicos e/ou estresse abiótico. Foram detectadas pela primeira vez no início da década de 70 em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infectadas com o vírus do mosaico (TMV) (VAN LOON; VAN KAMMEN, 1970). Elas oferecem resistência local e sistêmica em resposta a patógenos, após o reconhecimento dos elicitores por receptores da planta (DIXON & HARRISON, 1990; VAN LOON *et al.* 1994; GUZZO, 2003).

As proteínas PRs apresentam propriedades bioquímicas específicas, que as diferencia das demais proteínas. Elas apresentam baixo peso molecular (6-43 kDa), são estáveis e de fácil extração em pH baixo (< 3), termoestável e altamente resistente a proteases (enzimas que decompõem proteínas). Tais características são importantes na funcionalidade dessas proteínas, já que estando presente no fluido intercelular, estão sujeitas a condições de baixo pH e à ação de enzimas proteolíticas, durante a patogênese, como resultado do colapso de células hospedeiras e extravasamento do conteúdo dos vacúolos. Muitas dessas proteínas apresentam tanto isoformas ácidas quanto básicas, geralmente localizadas no apoplasto e no vacúolo, respectivamente. Essas proteínas são localizadas, em sua maioria, no vacúolo e no apoplasto, sendo o último principal sítio de sua

acumulação. Desde sua descoberta, as proteínas PRs têm sido identificadas em diversas espécies de plantas mono- e dicotiledôneas (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999; VAN LOON, 1999; VAN LOON *et al.*, 2006; EDREVA, 2005).

Baseada na sua estrutura primária, relações imunológicas e propriedades enzimáticas, as proteínas PRs são agrupadas em 17 famílias (Tabela 1), numeradas na ordem em que foram descobertas, apresentando as mais diferentes formas e funções (GORJANOVIC, 2009). Um membro padrão é escolhido e as famílias são definidas com base em propriedades bioquímicas e biológicas comuns (VAN LOON *et al.*, 2006). Dentro de cada família existem várias classes compostas de diferentes isoformas.

O termo proteína PR abrange um grande número de proteínas com diferentes atividades bioquímicas e enzimáticas, tais como: glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, -4, -8, e -11) que podem atuar contra fungos e bactérias; proteinase (PR-6) que podem atuar contra nematódeos e insetos herbívoros; endoproteinases (PR-7) que podem auxiliar na dissolução da parede microbiana; peroxidases (PR-9) atua no espessamento da parede celular. Pequenas proteínas como defensinas (PR-12), tioninas (PR-13) e proteínas de transportadora de lipídios (PR-14) exibem atividade antifúngica e antibacteriana, exercendo seu efeito ao nível da membrana plasmática do microrganismo alvo (HOFFMANN-SOMMERGRUBER, 2002; VAN LOON & VAN STRIEN, 1999; VAN LOON, 1999; VAN LOON *et al.*, 2006; ELVIRA *et al.*, 2008; EDREVA, 2005). De todas as proteínas PRs já descritas, a proteína PR-1 até hoje continua um mistério. O mecanismo de ação que resulta em suas propriedades antifúngicas permanece desconhecido.

As proteínas PR-15, PR-16 são típicas de monocotiledôneas e inclui famílias de proteínas oxidase e “oxalato-oxidase-like” com atividade de superóxido desmutase, respectivamente. A proteína PR-17 contém sequência semelhante ao sítio ativo das zinco-metaloproteinase, no entanto tem permanecido sem caracterização (VAN LOON, 2006). Em virtude de sua importância na resistência do hospedeiro contra patógenos, as proteínas PRs vêm sendo cada vez mais estudadas. Sabe-se que a maioria dessas proteínas apresenta atividades antifúngicas.

Tabela 1: Classificação das proteínas PRs, de acordo com suas propriedades e mecanismo de ação.

Família	Propriedade	Mecanismo de Ação
PR-1	Antifúngicas, 14-17kDa	Desconhecido
PR-2	Classe I, II e III endo- β -1,3-glucanases, 25-35kDa	Ação catalítica de hidrólise de β -1-3-glucanases
PR-3	Classe I, II, III, IV, V, VI, VII endoquitinases, acima de 30kDa	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-4	Antifúngicas, atividade de quitinases, domínio C-terminal, 13-19kDa	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-5	Antifúngicas	Permeabiliza a membrana de fungos
PR-6	Inibidores de proteases, 6-13kDa	Inibidores de proteinases
PR-7	Endoproteases	Atividade endo-proteolítica
PR-8	Classe III das quitinases, ação Lisozima	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-9	Peroxidases e proteínas como peroxidases	Síntese de lignina
PR-10	Ribonucleases	RNAses
PR-11	Atividade endo-quitinases	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-12	Defensinas de plantas	Atividade antimicrobiana
PR-13	Tioninas	Atividade antimicrobiana
PR-14	Proteínas de transferência de lipídeos não específicos	Atividade antimicrobiana
PR-15	Oxidase de oxalato	Catálise da formação de peróxido de hidrogênio
PR-16	Proteínas como as que oxidam o axalato	Catálise da formação de peróxido de hidrogênio
PR-17	Desconhecidas	Desconhecida

Fonte: Van Loon *et al.*, 2006.

1.6 Proteínas transportadoras de lipídeos

Em plantas, as proteínas transportadoras de lipídeos (*Lipid Transfer Proteins* – LTPs) são peptídeos antimicrobianos, membro da família de proteínas relacionadas à patogênese (PR-14). São proteínas pequenas, básicas (ponto isoelétrico 8–10) e abundantes (4% do total de proteínas solúveis) em plantas superiores, são codificadas por uma pequena família multigênica em diversas espécies de plantas. Inicialmente foram caracterizadas pela sua habilidade em transferir moléculas de lipídeos entre membranas e vesículas artificiais *in vitro*

(Figura 4) (KIRUBAKARAN, 2008; CARVALHO & GOMES, 2007; KADER, 1996).

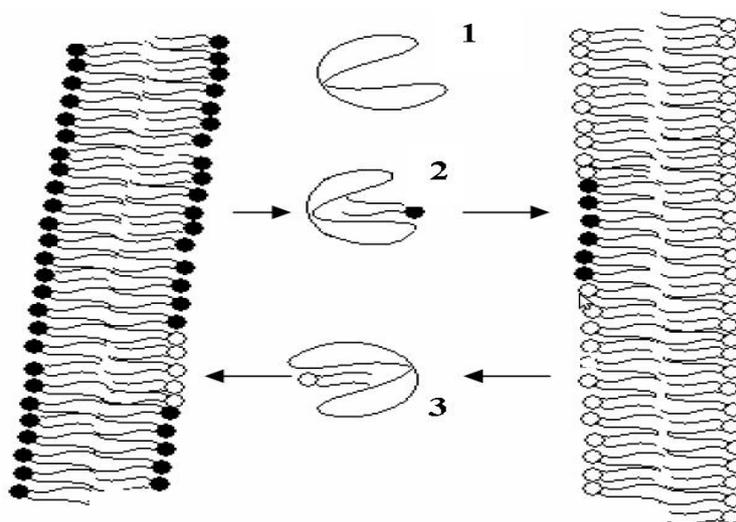


Figura 4: Modelo proposto para LTPs trocarem lipídios entre membranas. **1** proteína transportadora de lipídeo capaz de formar complexos reversíveis em fosfolípidios; **2** e **3** permitindo a troca dos fosfolípidios ligados entre membranas. Adaptada de Kader (1997).

Esta habilidade em transferir lipídeos, *in vitro*, acabou por sugerir um papel citoplasmático para estas proteínas na biogênese de membranas e regulação do *pool* de ácidos graxos intracelulares (KADER *et al*, 1984). Porém, a maioria das LTPs identificadas apresentam um peptídeo sinal (BROEKAERT *et al*, 1992) e está localizada extracelularmente ou associada com a parede celular (THOMA *et al*, 1994; CARVALHO *et al.*, 2004). Com isso, o papel intracelular proposto para essas proteínas se tornou inviável. Sendo assim, foi sugerido que elas estivessem envolvidas em outras funções como biossíntese de cutina e cera através de sua habilidade de carrear cadeias acil ou monômeros de cutina (HOLLENBACH *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2008), em papel de defesa contra patógenos fúngicos e bacterianos (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1995, JUNG *et al.*, 2005) e no controle de condições de estresse abiótico ocasionado por temperatura ou seca (LARSEN & WINTHER, 2001; WANG *et al.*, 2009).

LTPs já foram identificadas em várias espécies de plantas incluindo cevada (*Hordeum vulgare*) (MOLINA *et al.*, 1993), videira (GIRAULT *et al.*, 2008), trigo (SUN *et al.*, 2008), *Arabidopsis thaliana* e espinafre (*Spinacia oleracea*) (SEGURA *et*

al.,1993), cebola (CAMMUE *et al.*,1995), pimentão (*Capsicum annum*) (DIZ *et al.*, 2011), *Leonurus japonicus* Houtt (YANG *et al.*,2008), Café (*Coffea canephora* Pierre) (ZOTTICH *et al.*, 2011).

1. 7 Classificação das LTPs

As LTPs apresentam peso molecular variando de 7 a 10 kDa, contendo de 70 a 95 resíduos de aminoácidos, além de serem ricas em cisteínas (8 resíduos). Essas proteínas já foram identificadas em diversos tecidos de muitas espécies de mono e dicotiledôneas. Estão subdivididas em duas famílias de acordo com a massa molecular, LTP1 (9 a 10 kDa) e LTP2 (7 kDa) (SELS, 2008; DIZ *et al.*, 2006; DOULIEZ *et al.*, 2000).

As LTPs1 possuem de 90 a 95 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 9 a 10 kDa. Essas proteínas são ricas em glicina, prolina, alanina e serina, com um baixo número de resíduos aromáticos (KADER, 1996; DOULIEZ *et al.*, 2000, CARVALHO & GOMES, 2007). Apresentam uma estrutura compacta com quatro alfa-hélice conectadas “loops” e um segmento C-terminal composto por uma cavidade hidrofóbica, a qual acomoda diferentes ligantes hidrofóbicos (KADER, 1996; DOULIEZ *et al.*, 2000; RAMIREZ-MEDELES *et al.*, 2003, ZAMAN & ABBASI, 2009).

As LTPs2 possuem aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 7 kDa e tem sido pouco isolada e caracterizada em plantas. Sua estrutura tridimensional é estabilizada por pontes dissulfeto, como nas LTPs1, sendo que existe uma diferença quanto à organização dos “motifs” de CxC (SAMUEL, 2002).

Essas proteínas compartilham algumas características em comum, são peptídeos pequenos, básicos, com ponto isoelétrico entre 8.8 e 10,0, apresentam peptídeo sinal na região N-terminal e possuem oito resíduos de cisteínas em posições conservadas. As cisteínas são responsáveis pela formação de quatro pontes dissulfeto, dando estabilidade a proteína e a formação de uma cavidade hidrofóbica (KADER, 1996; PADOVAN *et al.*, 2010, DIZ *et al.*, 2011). Essas são características conservadas na maioria das LTPs já descritas, embora já tenham sido identificadas LTPs que apresentam algumas particularidades como, por exemplo, em *A. thaliana* foram identificadas três LTPs ácidas (ARONDEL *et al.*, 2000). Em frutos

de *Capsicum chinense* durante o processo de amadurecimento, foi identificado a expressão LTP com características típicas desta classe de proteínas, mas que diferia das LTPs até então descritas pela presença de 137 resíduos de aminoácidos e um ponto isoelétrico de 7,5 (LIU *et al.*, 2006).

1.8 Atividade biológica das LTPs

Baseado nas propriedades *in vitro* em transferir lipídeos ligados a cadeia acil, as LTPs estão envolvidas em várias funções celulares como: biogênese da membrana, formação de cutina, embriogênese, defesa contra fitopatógenos, simbiose, adaptação da planta a várias condições ambientais e sinalização da planta (CHEN *et al.*, 2011).

O papel de defesa das LTPs tem sido reforçado em virtude da identificação de que essas proteínas ligam-se a um receptor (elicítina) na planta envolvido no controle de resposta de defesa, postulando que as LTPs também podem estar envolvidas na sinalização de vias que levam a uma reação de hipersensibilidade (BUHOT *et al.*, 2001). Em *A. thaliana* foi identificado um gene LTP “like” que está envolvido na produção e transmissão de sinais móveis na SAR (MALDONADO *et al.*, 2002; LASCOMBE *et al.*, 2008).

Da semente de feijão (*Phaseolus mungo*) foi isolada uma LTP, que apresentou atividade antifúngica contra *F. solani*, *F. oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* e *Sclerotium rolfii* e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, porém não teve nenhum efeito sobre *Salmonella typhimurium*. Além da atividade antimicrobiana, foi identificada a capacidade de transferência de lipídeos, dessa proteína, similar às LTPs de milho e de trigo (WANG *et al.*, 2004).

A LTP Ha-AP10, isolada de semente de girassol (*Helianthus annuus*) após indução por estresse durante a germinação, apresentou forte atividade antimicrobiana contra fungos modelos, como *F. solani*, contudo quando testada contra o fungo *Alternaria alternata*, um dos maiores causadores de doença no girassol, a mesma apresentou uma baixa inibição. A proteína isolada apresentou atividade antimicrobiana contra *A. alternata* apenas quando testada em altas concentrações (200 µg/ml). Quando testada em concentrações menores, as quais são freqüentemente usadas para outros peptídeos antimicrobianos que participam da resposta de defesa, não observou-se efeito inibitório nesse fungo (BROEKAERT *et*

al., 1997). Esta observação pôs em questão a função de Ha-AP10 como proteína de defesa e sugeriu uma função relacionada à mobilização de lipídeos de reserva (GONORAZKY *et al.*, 2005).

Em um trabalho com uma LTP isolada de semente de *L. japonicus* Houtt (LjAMP2), a mesma apresentou atividade inibitória contra vários fungos e bactérias, mas outros patógenos testados não sofreram qualquer inibição; como *Agrobacterium radiobacter* e a *Escherichia coli* (YANG *et al.*, 2006). A Ace-AMP é uma potente LTP de semente de cebola que inibiu cerca de 12 fungos testados e algumas bactérias gram positivas, entretanto, quando testada com bactérias gram negativas, não houve qualquer inibição (Cammue *et al.*, 1995). As LTPs, em geral, podem causar inibição para alguns patógenos, mas não para outros. A capacidade de inibição dessas proteínas está intimamente relacionada à interação delas com receptores de patógenos que vão determinar a ocorrência ou não da atividade inibitória.

A partir do momento em que foi descoberto que as LTPs eram peptídeos com capacidade de inibir fitopatógenos, tem-se especulado se este efeito poderia resultar da interação da LTP com membranas biológicas, levando à possível permeabilização da membrana devido à perda da integridade da mesma. Regente *et al.* (2005) isolaram uma proteína que apresentou homologia com LTPs de plantas (HaAP10) e que mostrou capacidade de permeabilização da membrana do fungo *F. solani*. Esta ação pôde ser detectada pelo uso do corante de ácido nucleico SYTOX green, que penetra em membranas celulares comprometidas.

Cruz *et al.* (2010), a partir de sementes de pimenta isolaram uma sequência parcial de um peptídeo que possui identidade com LTP, sendo o mesmo eficiente contra fungos (*F. oxysporum*, *Colletotrium lindemuthianum*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*). Utilizando SYTOX green foi possível verificar que a membrana dos patógenos testados foi comprometida quando em contato com a proteína. Esse resultado assim como o de Regente *et al.* (2005) sugere que a membrana dos patógenos pode ser o alvo potencial dessas LTPs.

Estudos com LTPs de sementes de arroz mostraram que a presença de moléculas de esterol em elicinas é uma etapa essencial para o reconhecimento do receptor na membrana para causar defesa da planta. Moléculas de esterol podem interagir com receptor de membrana da planta, induzir uma via de sinalização e promover a resposta de defesa em plantas para inibir agentes patogênicos (CHENG

et al. 2004). Com esse resultado é possível inferir que haja uma ligação das LTPs nas membranas e um possível papel na defesa de plantas.

Na área da biologia molecular já foram identificadas algumas LTPs com potencial biotecnológico. Quando o gene *ltp2* de *Hordeum vulgare* foi super-expresso em *N. tabacum* e *A. thaliana* ocorreu o aumento da tolerância para patógenos bacterianos (MOLINA & GARCIA-OLMEDO, 1997). Plantas transgênicas de *A. thaliana*, super-expressando uma CALTP1 de *Capsicum annuum*, também apresentaram resistência aumentada para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e para o fungo *Botrytis cinerea*. Estas plantas transgênicas também apresentam altos níveis de tolerância para Cloreto de Sódio e estresses a seca (JUNG *et al.*, 2005).

1.9 Distribuição e localização das LTPs

As LTPs geralmente apresentam uma sequência de peptídeo (peptídeo sinal) que direciona a proteína para via secretora, essas proteínas podem ser encontradas na parede celular e no espaço extracelular (KADER, 1996; CARVALHO & GOMES, 2007). No limoeiro infectado com fungo, foi identificado uma LTP, denominada RlemLTP, com atividade antifúngica. Quando se verificou a localização da RlemLTP utilizando sonda marcada (GFP), a mesma encontrava-se nos cloroplastos, contudo ainda não foi elucidado o papel desta proteína nesta organela (NISHIMURA *et al.*, 2008). Outras proteínas com atividade antimicrobiana têm sido encontradas nos cloroplastos, tais como AP24 do tomate, que estão relacionadas a resistência sistêmica adquirida (JEUN & BUCHENAUER, 2001).

1.10 LTP em pimenteira-do-reino

Estudos realizados por de Souza *et al.* (2011) possibilitaram a identificação de 87 seqüências de cDNAs diferencialmente expressas na pimenteira-do-reino em resposta à infecção pelo fungo *F. solani* f. sp. *piperis*. Dentre as seqüências de proteínas PRs, está a seqüência GW667507 registrada no GenBank do NCBI, que codifica para uma LTP, visto que de acordo com análises comparativas em bancos de dados apresentou alta identidade com LTPs de *Populus trichocarpa* (XP_002312129) e *Ricinus communis* (XP_002524256).

Esta seqüência foi denominada PnLTP e apresentou 479 pb constituindo uma seqüência de cDNA parcial, pois contem o códon de término, mas não o sinal de poliadenilação e a cauda poli-A na extremidade 3', assim como não apresenta o códon de inicio (ATG) na extremidade 5'. Sendo assim, estudos adicionais são necessários para a obtenção de sua seqüência de cDNA completa.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Isolar e caracterizar uma seqüência nucleotídica da PnLTP durante a interação entre a pimenteira-do-reino e o fungo *F. solani* f. sp. *piperis*.

Objetivos específicos:

Isolar a sequência completa de cDNA e genômica da PnLTP;

Caracterizar as seqüências obtidas, utilizando programas computacionais;

Expressar a proteína PnLTP em sistema bacteriano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 RNA total da raiz de pimenteira

Neste trabalho foi utilizado uma amostra de RNA total das raízes de pimenteira-do-reino infectadas pelo *F. solani* f. sp. *piperis*, proveniente do trabalho realizado por de Souza *et al.* (2011), disponível no Laboratório de Biologia Molecular da UFPA. O RNA total foi extraído utilizando a metodologia descrita por Jones *et al.* (1985).

3.2 Extração de DNA genômico de pimenteira

Para obtenção da sequência genômica de PnLTP, o DNA genômico foi extraído de folhas de pimenta-do-reino utilizando o *Purelink plant total DNA purification kit* (Invitrogen, EUA), conforme orientações do fabricante.

Inicialmente as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de cadinho e pistilo. O macerado foi transferido para um tubo (1,5mL) e adicionado 250 µL de tampão de ressuspensão, 15µL de SDS 20% e 15µL de RNase (20mg/mL). Depois de homogeneizado, o extrato foi incubado a 65°C durante 15 minutos e em seguida centrifugado a 19.940 g por 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 100 µL de tampão de precipitação e a suspensão resultante foi incubada em gelo por 5 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 19.940 g por 10 minutos. Em um novo tubo (1,5mL) foram adicionados 250µL do sobrenadante e 375µL de tampão de ligação. Depois de homogeneizado, o material foi transferido para uma coluna e centrifugado a 10.174 g por 1 minuto. A coluna foi lavada duas vezes com 500µL de tampão de lavagem e centrifugada a 10.174 g por 1 minuto em cada lavagem. Uma centrifugação adicional a 10.174 g por 2 minutos foi realizada para retirar resquícios do tampão, a coluna foi transferida para um novo tubo (1,5mL). Neste novo tubo foram adicionados 100µL de tampão de eluição, pré aquecido a 65°C, à coluna que foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e a suspensão foi centrifugada a 10.174 g por 2 minutos. Essa última etapa de eluição foi repetida uma vez.

3.3 Desenho dos iniciadores

Para desenhar os iniciadores foi utilizado o programa Vector NTI (Invitrogen, EUA). A partir da seqüência parcial de PnLTP foram desenhados quatro iniciadores LTP-F1 e F2 e LTP-R1 e R2, para amplificar as extremidades 5' e 3'. Tendo identificada a seqüência completa de cDNA, foram desenhados iniciadores para confirmar a ORF (*open-reading frame*) da PnLTP: LTP-ORF-F1 e LTP-ORF-R1. Esses iniciadores também foram utilizados para obtenção da seqüência genômica de PnLTP, através da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para inserir a PnLTP no vetor de expressão, foram desenhados iniciadores contendo sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, baseados nos iniciadores da ORF, os quais foram denominados LTP-ORF-E-F1, LTP-ORF-E-R1, responsáveis pela amplificação da sequencia correspondente a proteína com peptídeo sinal e LTP-ORF-E-F2, LTP-ORF-E-R1 responsáveis pela amplificação da sequencia correspondente a proteína sem peptídeo sinal, ou seja, proteína madura.

3.4 Amplificação das extremidades 5' e 3' do cDNA da PnLTP

As extremidades 5' e 3' do cDNA da PnLTP foram obtidas por meio de experimentos de RACE (*Rapid Amplification of cDNAs Ends*) utilizando-se o *SMART RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech, EUA), de acordo com orientações do fabricante.

Para a síntese da primeira fita de cDNA 5' RACE, alíquotas de 2,75µL (1 µg) de RNA total foram misturadas com 1µL de 5' – CDS *primer A* (10µM). A mistura foi incubada a 70°C por 3 minutos em termociclador, sendo em seguida resfriada por 2 minutos no gelo. Foram adicionados à mistura, 2µL de tampão *First-Strand 5X*, 1 µL de DTT (20 mM), 1 µL de dNTP Mix (10 mM), 0,25 µL de Inibidor de RNase (40 U/µL), 1 µL de *SMARTScribe Reverse Transcriptase* (100U/µL) e 1 µL de *SMARTer II A Oligo* (10µM). A amostra foi incubada a 42°C por 90 minutos, e em seguida diluída em 50 µL de tampão Tricina-EDTA.

Para síntese da primeira fita de cDNA 3' RACE, alíquotas de 3,75µL (1 µg) de RNA total foram misturados com 1µL de 3'–CDS *primer A* (10µM). A mistura foi incubada a 70°C por 3 minutos em termociclador, sendo em seguida resfriada por 2 minutos no gelo. Foram adicionados a mistura, 2µL de tampão *First-Strand 5X*, 1 µL

de DTT (20 mM), 1 μ L de dNTP Mix (10 mM), 0,25 μ L de Inibidor de RNase (40 U/ μ L), 1 μ L de *SMARTScribe Reverse Transcriptase* (100 U/ μ L). A amostra foi incubada a 42°C por 90 minutos e em seguida diluída em 50 μ L de tampão Tricina-EDTA. Uma amostra contendo 1 μ L (100ng) de cada cDNA sintetizado (5' e 3' RACE) foi utilizada na PCR.

Em tubos separados, foi realizada PCR primária tanto para obtenção da extremidade 5' quanto da 3', utilizando os seguintes reagentes comuns para ambas extremidades: 36 μ L de água, 5 μ L de tampão Advantage 2 PCR, 1 μ L de dNTP, 5 μ L de UPM (10 μ M) e 1 μ L 50 X Advantage 2 Polymerase Mix. Para a PCR primária da extremidade 5' foram adicionados 1 μ L do iniciador LTP-R1 (10 μ M) e 1 μ L do cDNA 5' RACE (100ng), e para a PCR primária da extremidade 3' foram adicionados 1 μ L do iniciador LTP-F1 (12 μ M) e 1 μ L do cDNA 3' RACE (100ng). Para amplificação do fragmento foi utilizado termociclador Veriti (Applied Biosystems) nas seguintes condições de temperatura e tempo: desnaturação inicial (94°C - 30 segundos), desnaturação (95°C - 30 segundos), anelamento (60°C - 30 segundos) e extensão (72°C - 3 minutos), com um total de 25 ciclos. Uma amostra contendo 5 μ L do produto da PCR primária foi utilizada como molde para a PCR secundária.

Na PCR secundária foram adicionados 36 μ L de água, 5 μ L de tampão Advantage 2 PCR, 1 μ L de dNTP e 1 μ L (10 μ M) de *Nested primer*, em ambos os tubos de 5' e 3'. Para a extremidade 5' foi adicionado 1 μ L de iniciador LTP-R2 (10 μ M) e 5 μ L do cDNA da PCR primária 5' e para a extremidade 3' foi adicionado 1 μ L de iniciador LTP-F2 (10 μ M) e 5 μ L do cDNA da PCR primária 3'. Na amplificação foram utilizadas as mesmas condições utilizadas na PCR primária.

3.5 Amplificação de fragmentos correspondentes a ORF da PnLTP

Após a obtenção do cDNA completo de PnLTP, foi desenhado um par de iniciadores (LTP-ORF-F1 e LTP-ORF-R1) flanqueando a sua ORF. A amplificação da ORF foi realizada através de ensaios de PCR que continham: 5 μ L de DNA (100ng), 5 μ L de tampão 10X, 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM), 1 μ L de dNTPs (10mM), 1 μ L de cada iniciador LTP-ORF-F1 (10 μ M) e LTP-ORF-R1 (10 μ M), 0,5 μ L de Taq polimerase (5U/ μ L) e 35 μ L de água MiliQ. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por

5 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto (30 ciclos), e por último uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O mesmo par de iniciadores da ORF e o mesmo programa de PCR foram utilizados na amplificação da sequência genômica da PnLTP.

3.6 Purificação dos fragmentos

Os produtos obtidos na PCR foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, EUA), conforme recomendações do fabricante. Os fragmentos foram excisados do gel e transferidos para tubos (1,5mL), posteriormente foram adicionados 800µL de tampão de solubilização ADB, sendo em seguida incubado em banho-maria a 55° C até a dissolução completa da agarose. Em seguida, a solução foi adicionada em coluna de sílica, que retém o DNA, a qual foi lavada duas vezes com 200µL de tampão de lavagem. Por fim, foram adicionados 10µL de tampão de eluição, pré aquecido a 55°C, no centro da coluna, a qual foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a coluna foi centrifugada por 2 minutos a 10.174 g e o DNA foi coletado.

3.7 Clonagem dos fragmentos

Os fragmentos purificados foram inseridos no vetor pGEM-T Easy (Promega, EUA), conforme orientação do fabricante. Em um tubo (0,5mL), foram adicionados 5µL de *2X Rapid Ligation Buffer*, 1µL de pGEM-T Easy (50ng), 3µL (100ng) do produto purificado da PCR, 1µL de T4 DNA ligase (5U/ µL). O sistema de ligação foi incubado a 4°C por 12 horas.

A transformação foi realizada em *E. coli* (estirpe XL -1 blue, da Stratagene) através de eletroporação utilizando o Eletroporador 2510 (Eppendorf). As células competentes (50µL) e o sistema de ligação (1µL) foram transferidos para uma cubeta pré-resfriada e submetidos a uma voltagem de 1700 volts. Em seguida, foi adicionado 1mL de meio líquido Luria Bertani (LB) à cubeta para recuperar as células e a cultura foi incubada a 37°C por uma hora, para crescimento. Por último, as

bactérias foram espalhadas em placa de Petri contendo meio LB ágar com antibióticos (50µg/mL de canamicina e 100µg/mL de ampicilina). Para identificação das bactérias recombinantes foi utilizado X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e IPTG (isopropiltiogalactosídeo).

As colônias brancas foram analisadas através de PCR, utilizando iniciadores específicos (M13 – F e M13 – R) para o vetor pGEM-T Easy, para confirmar se eram recombinantes, bem como verificar o tamanho do inserto. As colônias foram coletadas com palito esterilizado, que e em seguida adicionadas em 50µL de água destilada autoclavada. As células foram lisadas, colocando-se o tubo em água fervente (~100°C) por 5 minutos, o qual foi posteriormente centrifugado a 10.174 g por 10 minutos.

Para os ensaios de PCR foram utilizados 5µL de lisado bacteriano, 5µL de tampão 10X, 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 1µL do iniciador M13-F (10µM), 1µL do iniciador M13-R (10µM), 0.5µL de Taq polimerase (5U/µL) e 35µL de água MiliQ. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems) nas seguintes condições de temperatura e tempo: desnaturação inicial (95°C por 5 minutos), desnaturação (95°C - 30 segundos), anelamento (55°C - 30 segundos) e extensão (72°C - 1 minuto), com um total de 30 ciclos. Para confirmar a amplificação do inserto, o produto da PCR foi analisado em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

3.8 Seqüenciamento

O seqüenciamento dos clones foi realizado em sequenciador automático ABI 3130 (*Applied Biosystems*, EUA) utilizando o Kit Big Dye Terminator (*Applied Biosystems*, EUA) e os iniciadores M13 - F e M13 – R, específicos para o vetor de clonagem.

3.9 Análises computacionais

As seqüências obtidas foram analisadas através de programas computacionais e servidores on-line. Utilizamos a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi. As seqüências foram comparadas àquelas disponíveis nos bancos de dados de

seqüências nucleotídicas e de aminoácidos na busca por similaridade com seqüências já descritas.

O alinhamento múltiplo entre as seqüências obtidas e seqüências depositadas nos bancos de dados foi realizado através do programa Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994).

As seqüências nucleotídicas foram traduzidas em seqüências de aminoácidos utilizando-se as ferramentas de bioinformática oferecidas pelo ORF finder – NCBI (www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html).

Buscas por domínios protéicos foram feitas com o auxílio de ferramentas como Pfam (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml) e Motifs (<http://motif.genome.jp/>), e a predição do peso molecular das proteínas foi realizada com a ferramenta oferecida no Expasy (www.expasy.org/tools/pi_tool.html). Para predição de peptídeos sinais e a localização do sítio de clivagem utilizamos o Programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), predição da estrutura secundária utilizou-se o PSIPRED. A predição das pontes dissulfeto utilizando (DISULFIND; Ceroni *et al.*, 2006). A predição da estrutura tridimensional de PnLTP foi realizada por um servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>).

3.10 Produção da proteína recombinante PnLTP

Para a expressão, foram utilizados os iniciadores LTP-ORF-E-F1 e LTP-ORF-E-R1 na amplificação da sequencia com peptídeo sinal, e LTP-ORF-E-F2 e LTP-ORF-E-R1 na amplificação da sequencia correspondente a proteína madura. LTP-ORF-E-F1 e LTP-ORF-E-F2 continham sítios para a enzima *Nde*I, enquanto LTP-ORF-E-R1 continha sitio para *Xho*I. Estes iniciadores foram utilizados em uma PCR a partir do clone contendo a ORF da PnLTP.

O Vetor utilizado para a expressão foi o pET–29 (a) (Novagen, EUA), que possui vários elementos importantes para o controle da transcrição gênica como o gene *lac* I que codifica a proteína repressora que se liga ao operador *lac* e o promotor de transcrição T7 é específico para T7 RNA polimerase (e não para a RNA polimerase de bactéria). O controle do sistema de expressão pET é feito através do promotor e operador *lac* que controla a expressão tanto da T7 RNA polimerase como do gene de interesse clonado no vetor de expressão.

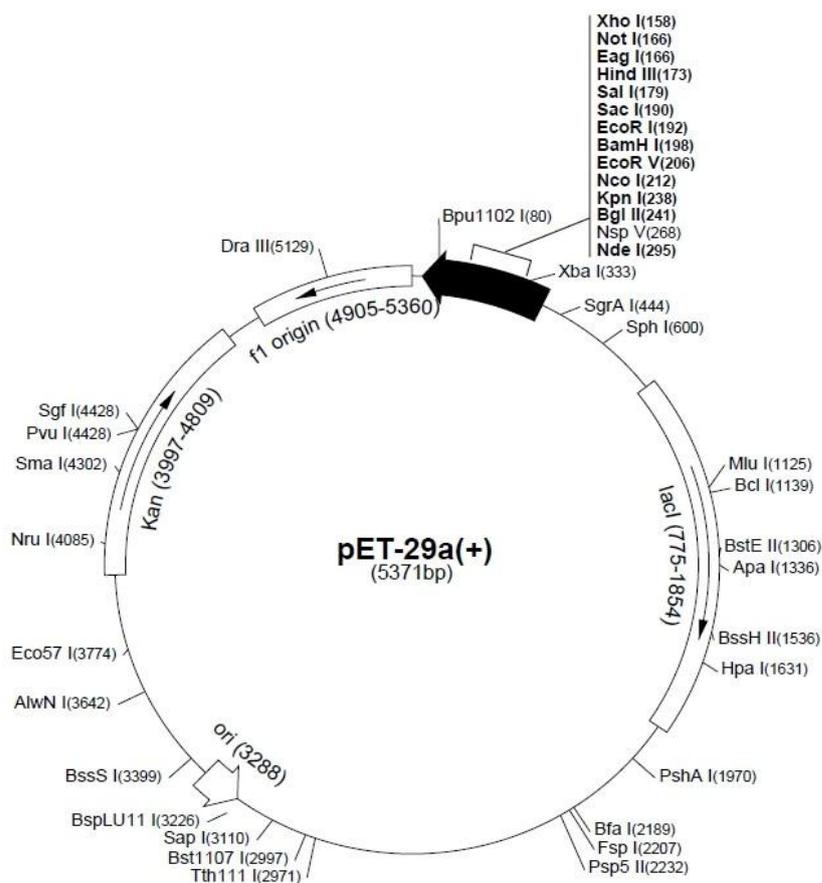


Figura 5: Mapa do vetor de expressão pET29a (Novagen, USA).

O produto da PCR foi purificado, e em seguida foi feita a digestão deste fragmento e do vetor, em sistemas separados, com a enzima *NdeI*. Após a purificação dos materiais digeridos, procedeu-se a digestão com a enzima *XhoI*. Por último, os materiais digeridos foram purificados a partir de gel de agarose, como descrito anteriormente.

Após a purificação do inserto e do vetor, procedeu-se a ligação dos mesmos com a enzima T4 ligase (Biolabs, UK). Em seguida, procedeu-se a transformação por eletroporação de células competentes TOPO10 (Invitrogen, USA). A confirmação do inserto foi feita através de PCR, verificando a amplificação do fragmento do tamanho esperado em gel de agarose.

Para a expressão, a construção pET-29a-PnLTP foi introduzida na bactéria *E. coli* (estirpe BL21DE3 Rosetta) através de eletroporação, sendo uma colônia recombinante inoculada em 5mL de meio LB contendo os antibióticos canamicina

(30µg/ml) e cloranfenicol (34µg/ml) e cultivada à 37°C sob agitação de 180 rpm durante 16 horas. Em seguida, 1 mL da cultura foi diluído em 100 mL de meio LB, também contendo os mesmos antibióticos, e cultivada a 37°C sob agitação de 180 rpm até atingir a OD₆₀₀ entre 0.7 e 0.8, o que requereu cerca de 4 horas. Então, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,4 mM para indução da expressão. A cultura permaneceu a 37°C sob agitação de 180 rpm por até 4 horas, da qual foram coletadas alíquotas de 1mL a cada 1 hora de incubação. O mesmo procedimento foi feito com a cultura não induzida com IPTG, a qual foi utilizada como controle negativo. Por último, as células foram centrifugadas por 20 minutos a 2.500 rpm, o sedimento foi lavado com 10mM de Tris-HCl e congelado a -20°C.

Para a obtenção dos extratos protéicos totais das células bacterianas, os sedimentos foram ressuspendidos em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 20 minutos e coleta do sobrenadante. Por último, os extratos protéicos das culturas induzidas e não induzidas foram analisados por experimentos de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), de acordo com metodologia descrita por Laemmli (1970).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do cDNA completo de PnLTP

O cDNA completo da PnLTP isolado utilizando-se experimentos de RACE apresentou 621 pb, com o códon de início ATG localizado na posição 33 nt e códon de termino TGA na posição 383 nt. Esse cDNA contém 32 pb na 5' UTR e 235 pb na 3', na qual foi identificado o sinal de poliadenilação TAATAA na posição 558 nt (dados não mostrados). Sua ORF de 354 pb codifica uma proteína deduzida de 117 aminoácidos (Figura 6), a qual foi comparada a sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Após análise comparativa da sequência utilizando o programa Blastx do NCBI foi possível identificar sequências com alta identidade com a PnLTP (Tabela 2).

1	M D T K S V R F F F L F G L L A V L V V G S V D G A G E C G	30
31	K N T N P D L E A F K L Y P C A M A A Q D V H V P V S D R C	60
61	C S Q V K R L W Q N P S C L C A V M L S N T A K S S G T K P	90
91	E V A I T I P K R C N L A D R H V G M K C G G Y T L P	

Figura 6: Sequência de aminoácidos deduzida da PnLTP.

Tabela 2: Análise comparativa da sequência da PnLTP com sequências depositadas no GenBank do NCBI.

Nº de acesso	Espécie	E value	Max Identidade
XP_002315191.1	<i>Populus trichocarpa</i>	6e-42	73%
ABQ41972.1	<i>Sonneratia apetala</i>	4e-37	72%
XP_002281554.1	<i>Vitis vinifera</i>	3e-37	71%
XP_003529127.1	<i>Glycine max</i>	8e-40	70%
ADQ57297.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	3e-37	70%
XP_003623166.1	<i>Medicago truncatula</i>	4e-39	68%
NP_568160.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-37	68%

4.2 Obtenção da sequência genômica da PnLTP

A amplificação da sequência genômica correspondente a ORF da PnLTP gerou um fragmento de 354 pb, que quando alinhado a sequência de cDNA revelou a ausência de introns na sequência codificante do gene PnLTP (dados não mostrados). Este resultado é similar a outros dados relatados na literatura, como em genes de LTPs de *A. thaliana* e arroz que também não apresentam introns (BOUTROT *et al.*, 2008).

4.3 Análise da sequência de aminoácidos da PnLTP

De acordo com as análises computacionais a PnLTP é constituída por 117 resíduos de aminoácidos, com massa molecular e ponto isoelétrico preditos de 12.59 kDa e 8.68, respectivamente. Na extremidade amino-terminal foi identificado um potencial peptídeo sinal de 25 resíduos de aminoácidos (MDTKSVRFFFLFGLLAVLVVGSVDG). Desta forma, a PnLTP madura apresenta 92 aminoácidos e uma massa molecular de 9.89 kDa.

O alinhamento entre a PnLTP e as sequências do GenBank que apresentaram alta identidade com a mesma que contam na Tabela 2 mostrou a presença de aminoácidos conservados, entre eles, os oito resíduos de cisteína. Na Figura 7, consta o peptídeo sinal presente em todas as sequências analisadas, assim como as cisteínas conservadas.

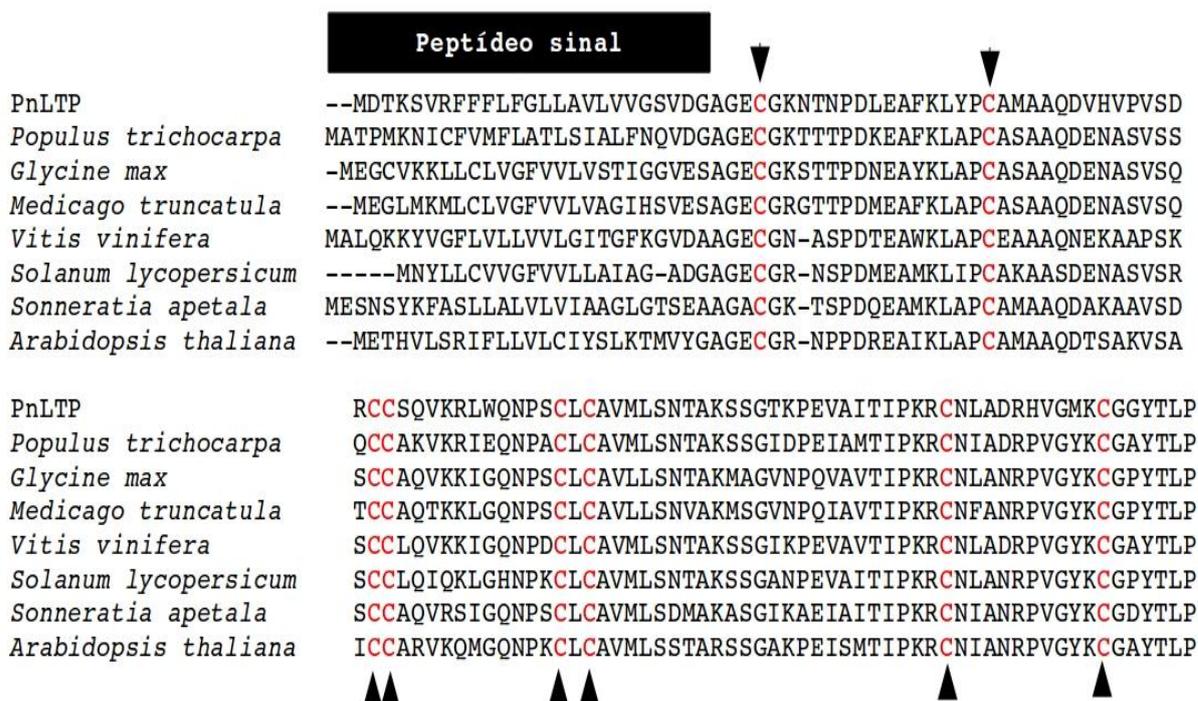


Figura 7: Alinhamento da PnLTP com seqüências de LTPs do GenBank. Em preto o peptídeo sinal enquanto as setas indicam os resíduos de cisteínas conservados.

A presença de peptídeo sinal é uma característica das LTPs, em virtude dessas proteínas estarem relacionadas à via secretora (ABROEKAERT *et al.*, 1992, KADER, 1996). As cisteínas estão conservadas (C-Xn-C-XnCC-Xn-CXC-CXn-C – 8-motivos de Cisteína, o X representa aminoácido), sendo esta distribuição característica das LTPs (KADER, 1996; BOUTROT *et al.*, 2008).

As cisteínas conservadas interagem dando origem a quatro pontes dissulfeto tornando a proteína mais resistente a variação de temperatura e a ação de enzimas proteolíticas (CERONI *et al.*, 2006). Na Figura 8 é mostrada a predição das pontes dissulfeto para a PnLTP.

A partir destas características identificadas na PnLTP é possível enquadrá-la como uma LTP do tipo1, em virtude do número de aminoácidos, da massa molecular e da distribuição das cisteínas (CARVALHO & GOMES, 2007).

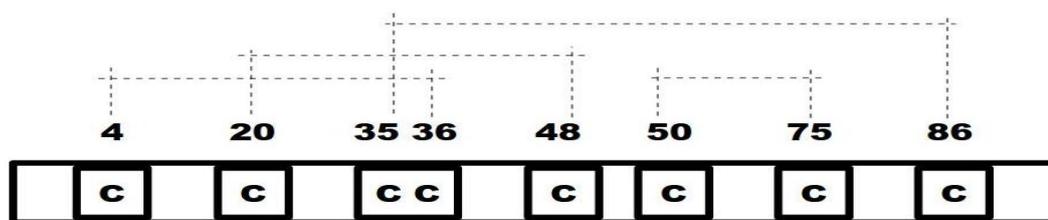


Figura 8: Predição das pontes dissulfeto na sequência da PnLTP.

As análises computacionais mostraram também que a PnLTP apresenta o domínio conservado AAI_LTSS (*Alpha-Amylase Inhibitors* (AAI), *Lipid Transfer* (LT) and *Seed Storage* (SS) (Figura 9), sendo esse domínio característico de uma família de plantas superiores que inclui: inibidores α -amilase, proteínas transportadora de lipídeos e proteínas de armazenamento da semente. Proteínas dessa família são conhecidas por desempenhar um papel importante na defesa da planta contra insetos e patógenos; transporte lipídico entre as membranas intracelulares e armazenamento de nutrientes (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2011).

Após a predição da estrutura secundária, utilizando o programa PSIPRED, foram identificadas uma alfa-hélice no peptídeo sinal e cinco alfa-hélices na proteína madura (Figura 9). Essas alfa-hélices podem auxiliar na conformação da cavidade hidrofóbica da proteína. Esses dados estão de acordo com os encontrados na literatura (KADER, 1996; DOULIEZ *et al.*, 2000; RAMIREZ-MEDELES *et al.*, 2003, ZAMAN & ABBASI, 2009)

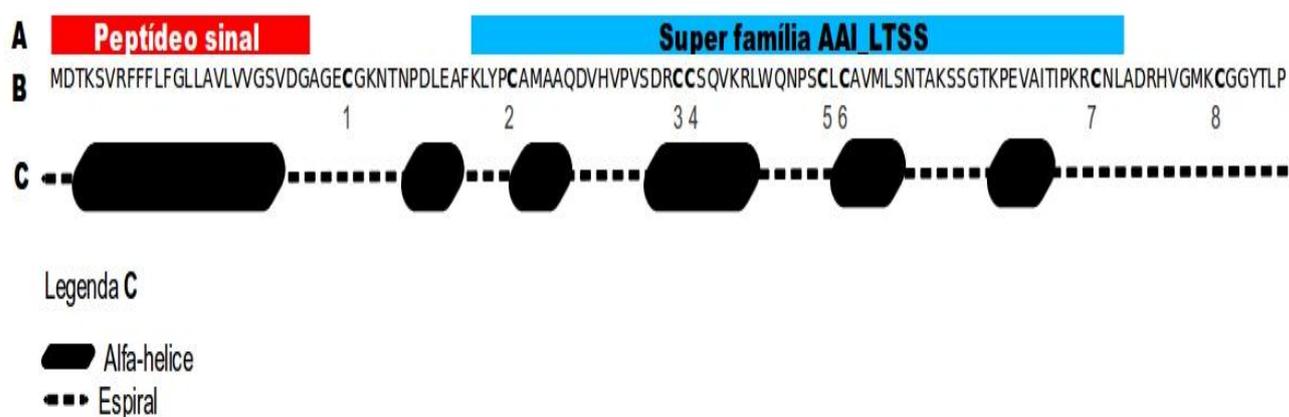
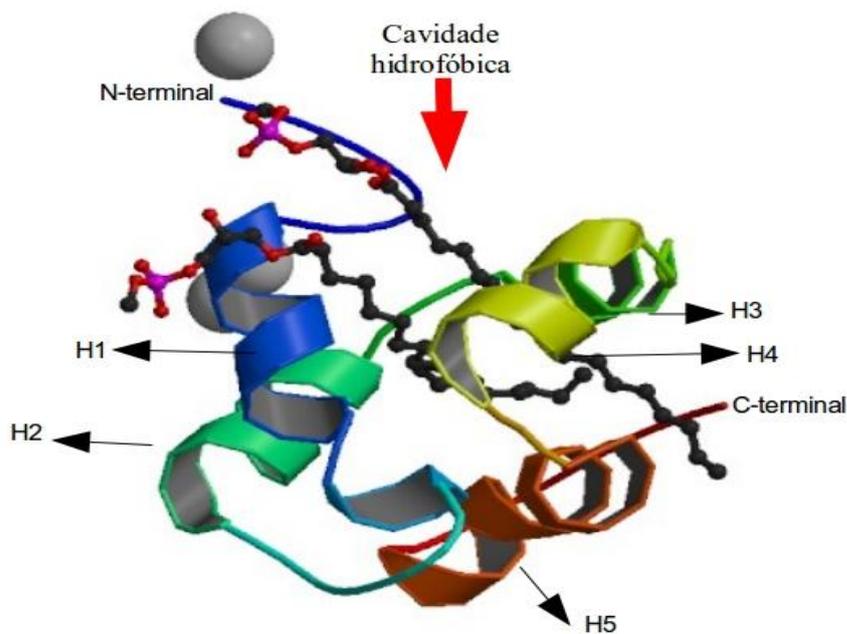


Figura 9: Sequência de aminoácidos da PnLTP, com a identificação das cisteínas, peptídeo sinal e domínio conservado e a estrutura secundária com a identificação das alfa-hélices.

A predição da estrutura tridimensional da PnLTP foi realizada através de modelagem por homologia, utilizando o servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>). PnLTP apresentou 26% de identidade com a estrutura cristalográfica de *A. thaliana* DIR1 (código de acesso PDB 2RKN), proteína que está envolvida com a sinalização de longa distância e associada com a resistência sistêmica adquirida, possuindo cinco alfa-hélices e uma cavidade hidrofóbica (Figura 10) (LASCOMBE *et al.*, 2008).



Fonte: PDB 2RKN

Figura 10: Estrutura tridimensional do DIR1 com a cavidade hidrofóbica e as cinco hélices (H1 a H5), de acordo com o relatado por Lascombe *et al.* (2008).

4.4 Clonagem da PnLTP no vetor de expressão pET29a

As sequências correspondentes as ORFs da PnLTP com e sem o peptídeo sinal foram inseridas no vetor de expressão pET-29a, gerando as construções pET29a-PnLTP1 e pET29a-PnLTP2, respectivamente. Na Figura 11 são mostrados os padrões de digestão destas duas construções com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Pode-se verificar que em ambos os casos houve a liberação de fragmentos com tamanhos esperados de acordo com a análise em gel de agarose.

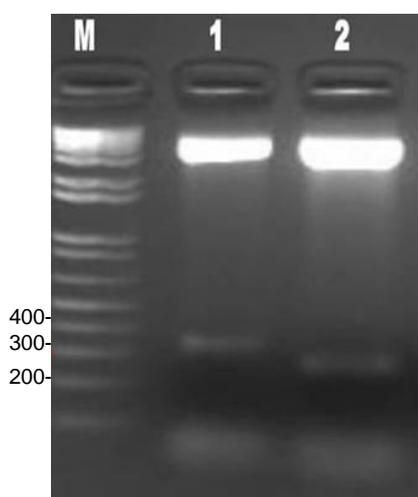


Figura 11: Amostras de DNA das construções pET29a-PnLTP1 (1) e pET29a-PnLTP2 (2) digeridas com as enzimas *NdeI* e *XhoI* analisadas em gel de agarose corado com brometo de etídeo. M: marcador 1 kb plus DNA ladder.

4.5 Produção da proteína PnLTP em bactéria

Para a expressão da proteína PnLTP foi utilizada a construção pET-29a-PnLTP2, que corresponde a proteína madura. Após quatro horas de indução com IPTG a 0,4mM e a 37°C, pode-se verificar a presença de uma banda de cerca de 10 kDa no extrato protéico das bactérias submetidas a indução, a qual está ausente na amostra não induzida (Figura 12), o que indica tratar-se da proteína de interesse.

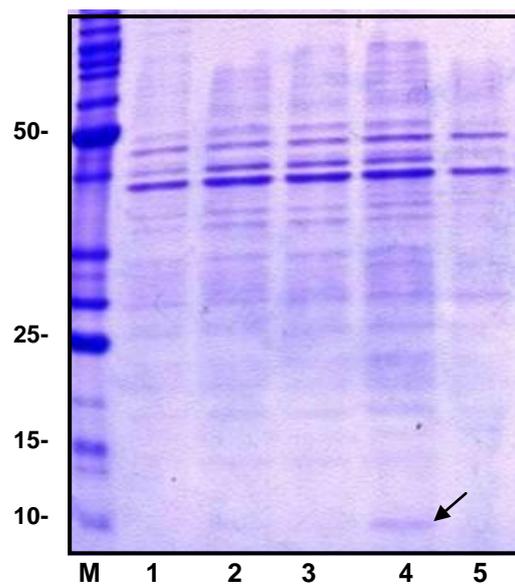


Figura 12: Extratos protéicos totais de bactérias contendo a construção pET29a-PnLTP1 analisados por SDS-PAGE 15%. M: marcador de massa molecular de proteína (kDa); 1-4: bactérias induzidas por IPTG por 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente; 5- bactérias não induzidas por IPTG por 4 horas. A seta indica a banda correspondente a PnLTP recombinante.

5. CONCLUSÕES

- Foi obtida a seqüência completa de cDNA da PnLTP, com 3' UTR de 32pb, ORF que codifica para uma proteína 117 aminoácidos e 5' UTR com 253pb;
- A PnLTP apresenta alta identidade com LTPs de outras espécies vegetais;
- Na seqüência de aminoácidos da PnLTP, foi identificada na região N-terminal uma seqüência de 25 aminoácidos, altamente hidrofóbica, possivelmente sendo um peptídeo sinal;
- Foram identificadas as cisteínas conservadas presentes na PnLTP, assim como foi predita a formação das pontes de dissulfeto e a possível conformação desta proteína em 3D;
- A proteína PnLTP na forma madura foi expressa em sistema bacteriano;
- Todas essas informações obtidas a respeito da proteína PnLTP, são de grande importância, em virtude de se buscar conhecer de que maneira as plantas respondem a ataques por patógenos e de que forma essa proteína atua a nível molecular.

REFERÊNCIAS

AGAREZ, F. V.; PEREIRA C.; RIZZINI, C. M. **Botânica Angiospermae**. 2ª edição. Rio de Janeiro. Editora:Âmbito Cultural, 1994.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology** 4 ed. San Diego: Academic Press., 1997.

ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R. Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino, em área de ocorrência de fusariose no Estado do Pará. Belém: EMBRAPA-CPATU, Documentos 59, 1991.

ALBUQUERQUE, F. C.; FERRAZ S. Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta-do-reino. **Experientiae**. v. 22, p. 133-151,1976.

ALBUQUERQUE, F.C. de; DUARTE, M. de L.R. Pimenta-do-reino e suas doenças na Região Amazônica. **Correio Agrícola**. v.213, p.114-119, 1977.

ALBUQUERQUE, F.C.; CONDURÚ, J.M.P. Cultura da pimenta do reino na Região Amazônica. Belém: **IPEAN**. v. 2, p. 149,1971.

ALBUQUERQUE, F.C.; VELOSO, C.A.C.; DUARTE, M. de L.R.; KATO, O.R. Pimenta-do-reino: recomendações básicas para seu cultivo. Belém: EMBRAPA, Belém: UEPAE. v. 12, p. 40,1989.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDO, A.; ALBUQUERQUE, F.C. de.; POLTRONIERI, M.C.; TULMANN NETO, A. Obtenção de mutantes resistentes à fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) através de irradiação gama. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇU, 1., Belém, 1996. Anais. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental / JICA, v. 89, p. 237-243, 1997.

ARIAS, T., POSADA, R.C. & BORNSTEIN, A. New combinations in *Manekia*, an earlier name for *Sarcorrhachis* (Piperaceae). **Novon**. v.16, p. 205-208, 2006.

ARONDEL, V., VERGNOLLE, C., CANTREL, C. E KADER, J.C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**. v.157, p.1-12, 2000.

ARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO T. Resistência de piperáceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* . **Acta Amazônica**. v. 31, p. 341-348, 2001.

BARBOSA, F. B. C. da. **Pesquisa agropecuária na Amazônia Brasileira: institucionalização e padrão do financiamento dos investimentos em C&T agrícola (1976 a 1995)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará,Belém, 1998.

- BARRETO-JUNIOR, C. B.; **Abordagem para a Síntese de Amidas Naturais Bioativas e seus Análogos**. Dissertação de Mestrado – UFRRJ, Seropédica, 2005. 178p.
- BENCHIMOL, R.L.; CHU, E.Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M.B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, p. 1343-1348, 2000.
- BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**. v. 340, p. 783-795, 2004.
- BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. **Annual Review of Phytopathology**, v.45, p.399–436, 2007.
- BORÉM, A. & MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 5ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 2009.
- BROEKAERT, W. F.; CAMMUE, B. P. A.; DE BOLLE, M. F. C.; THEVISSSEN, K.; DE SAMBLANX, G. and OSBORN, R. W. Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.16, p. 297-323,1997.
- BROEKAERT, W.F.; MARIEN, W.; TERRAS, F.R.G.; DE BOLLE, M.F.V.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLALEY, M.; RESS, S.B.; VANDERLEYDEN, A.; CAMMUE, B.P.A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**. v. 3, p. 4308-4314, 1992.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. & JANES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Library of Congress Cataloging-in- Publication Data, Rockville, Maryland, 2000.
- BUHOT, N., DOULIZ, J.P., JACQUEMARD, A., MARION, D., TRAN, V., MAUME, B.F., MILAT, ML., PONCHET, M., MIKES, V., KADER, J-C., BLEIN., J-P. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. **FEBS Letters**. v. 509, p. 27-30, 2001.
- BOUROT, F.; CHANTRET, N. and GAUTIER, M. Genome-wide analysis of the rice and *Arabidopsis* non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining, **BMC Genomics**, v. 9, p. 1-19, 2008.
- CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K.; HENDRIKS, M.; EGGERMONT, K.; GODERIS, I.J.; PROOST, P. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. **Plant Physiology**. v. 109, p.445-455, 1995.

CARVALHO, A. de O. & GOMES, V. M. "Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review,". **Peptides**, v. 28, p. 1144-1153, 2007.

CARVALHO, A. de O., TEODORO, C.E.S., DA CUNHA, M., OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L., OKOROKOV, L.A., FERNANDES, K.V.S., ET AL., Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. **Physiol Plantarum**, v.122, p.328-36, 2004.

CASTRO, F. M. de. **50 Anos da imigração japonesa na Amazônia**. Belém: Falangola, 1979.

CERONI, A.; PASSERINI, A.; VULLO, A. AND FRASCONI, P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server, **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 177-181, 2006.

CHEN, C.; CHEN, G.; HAO, X.; CAO, B.; CHEN, Q.; LIU, S. and LEI, J. CaMF2, an anther-specific lipid transfer protein (LTP) gene, affects pollen development in *Capsicum annuum* L. **Plant Science**. v. 181, p. 439-448, 2011.

CHENG, C-S., SAMUEL, D., LIU, Y-J., SHYU, J-C., LAI, S-M., LIN, K-F. E LYU, P-C. Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. **Biochemistry**. v. 43, p.13628-13636, 2004.

CHU, E. Y.; SOUZA, G. F. DE; CONCEIÇÃO, H., E., O., DA; POLTRONIERI, M. C.; DUARTE, M. DE L. R.; LEMOS, O. F.; OLIVEIRA, R. F. DE; BENCHIMOL, R. L. **A cultura da pimenta-do-reino**. 2. ed., Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

CLARKE, J.D., VOLKO, S.M., LEDFORD, H., AUSUBEL, F.M., DONG, X. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 12, p. 2175-2190, 2000.

CRUZ, L. P.; RIBEIRO, S. F. F.; CARVALHO, A. O.; VASCONCELOS, I. K.; RODRIGUES, R.; CUNHA, M. Da; GOMES, V. M. Isolation and Partial Characterization of a Novel Lipid Transfer Protein (LTP) and Antifungal Activity of Peptides from Chilli Pepper Seeds. **Protein & Peptide Letters**, v. 17, p. 311-318, 2010.

CORDEIRO, M.C.R & SÁ, M.F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Revista Biotecnologia**. v.10, p. 34- 39, 1999.

DASGUPA, A.; DATTA, P.C. Cytotaxonomy of piperaceae. **Cytologia**, v.41, p.697-706,1976.

de SOUZA, C. R. B.; SANTA BRÍGIDA, A.B.; DOS SANTOS, R.C.; COSTA, C.N.M.; DARNET, S.H.; HARADA, M. L. Identification of sequences expressed during compatible black pepper - *Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. **Acta Physiologiae Plantarum** v.33, p.2553-2560, 2011.

DIXON, R. A. & HARRISON, M. J. Genomic responses to environmental stress. **Adv. Genet.**, v. 28, p. 165-233,1990.

DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O. ; RODRIGUES, R. ; NEVES-FERREIRA, A. G. C., DA CUNHA, M.; ALVES E. W.; OKOROKOVA-FACANHA, A. L.; OLIVEIRA M. A. ; PERALES, J.; MACHADO O. L. T., GOMES V. M. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochim Biophys Acta** v.1760, p. 1323–1332, 2006.

DIZ, M. S.; CARVALHO, A. O. ; RIBEIRO, S. F.F.; CUNHA, M.; BELTRAMINI, L.; RODRIGUES, R.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O.L.T. and GOMES, V. M. Characterization, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 233-246, 2011

DOULIEZ, J.P., MICHON, T., ELMORJANI, K. e MARION D. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. **Journal of Cereal Science**, v. 32, p.1-20, 2000.

DUARTE, M. L. R. Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro . Belém: Embrapa-CPATU, 1999.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; CHU, E. Y.; BENCHIMOL, R. L.; POLTRONIERI, L. S. Manejo integrado da fusariose e da murcha amarela da pimenteira-do-reino: Poltronieri, L.S.; Trindade, D.R. (Ed.). Manejo integrado das principais doenças de cultivos amazônicos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 1-16, 2002.

DURRANT, W.E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p. 185-209, 2004.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. Piper: A Model Genus for Studies of Pytochemistry, Ecology, and Evolution. Kluwer Academic Publisher/New York, 2004.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**. v. 31, p. 105-124, 2005.

ELVIRA, M.I.; MOLINA GALDEANO, M.; GILARDI, P.; GARCÍA-LUQUE, I.; SERRA, M.T. Proteomic analysis of Pathogenesis-Related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of Experimental Botany**. v. 59, p. 1253-1265, 2008.

FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C.N., CHEN, Z., BATISTA, L.M., DUARTE, J., BORGES, A., TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**. v. 8, p. 677–700, 2007.

FILGUEIRAS, G. C. Crescimento agrícola no Estado do Pará e a ação de políticas públicas: avaliação pelo método shift-share. Belém – UNAMA (Dissertação – Mestrado em Economia), 2002. 156p.

FLOR, H.H. Current status of gene-a-gene concept. **Annual Review Phytopathology**. v. 9, p. 275-296, 1971.

GARCIA-OLMEDO, F., MOLIN, F., SEGURA, A. e MORENO, M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends in Microbiology**. v. 3, p. 72-74, 1995.

GARCIA, J.; KAMADA, T.; JACOBSON, T. K. B.; CURADO, M. A. e OLIVEIRA, S. M. Superação de dormência em sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 30, p. 51-54, 2000.

GENTRY, H.S. Introducing black pepper into América. **Economic Botany**, v.9, p.256-268, 1955.

GIRAULT, T.; FRANCOIS, J.; ROGNIAUX, H.; PASCAL, S.; DELROT, S.; COUTOS-THEVENOT, P.; GOMES, E. Exogenous application of a lipid transfer protein-jasmonic acid complex induces protection of grapevine towards infection by *Botrytis cinerea*, **Plant Physiology and Biochemistry**. v.46, p. 140–149, 2008.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p. 205-227, 2005.

GONORAZKY, A.G., REGENTE, M.C., DE LA CANAL, L. Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. **Journal of plant physiology**. v.162, p. 618-624, 2005.

GORJANOVIĆ, S. A Review: Biological and Technological Functions of Barley Seed Pathogenesis-Related Proteins (PRs). **Journal of the Institute of Brewing**. v.115, p. 334–360, 2009.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado de Ceará. *Rodriguesia*, v. 55, p. 21-46, 2004.

GUZZO, S. D. **Proteínas relacionadas à patogênese** In: Revisão Anual de Patologia de Plantas ed. Passo Fundo: RAPP, v.11, p. 283-332, 2003.

HAMADA, M.; UCHIDA, T.; TSUDA, M. Ascospore dispersal of the causal agent of *Nectria* blight of *Piper nigrum*. **Phytopathological Society of Japan Annals**. v. 54, p. 303-308, 1988.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. **Biochemical Society Transactions**, v.30, p.930-935, 2002.

HOLLENBACH, B., SCHREIBER, L., HARTUNG, W. e DIETZ, K-J., Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. **Planta**.v.203, p. 9-19, 1997.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola- 2012. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_20112.pdf

f.

JARAMILLO, M.A. & MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany** v.88, p. 706-716, 2001.

JEUN Y.C.; BUCHENAUER H. Infection structures and localization of the pathogenesis-related protein AP24 in leaves of tomato plants exhibiting systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* after pre-treatment with 3-aminobutyric acid or tobacco necrosis virus. **Journal of Phytopathology** v.149, p.141-153, 2001.

JONES, J. D.G.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. **The EMBO Journal** . v 4, p. 2411-2418, 1985.

JUNG, H.W., KIM, W., HWANG, B.K. Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (CALTPI) and the enhanced resistance of the CALTPI transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. **Planta**. v. 221, p. 361-373, 2005.

KADER, J. C. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. **Trends in Plant Science**. v. 2, p. 66-70, 1997.

KADER, J. C. Lipid-Transfer Proteins in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 47, p. 627-654, 1996.

KADER, J.C., JULIENE, M. and VERGNOLLE, C. Purification and characterization of a spinach leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. **European Journal of Biochemistry**. v.139, p.411-416,1984.

KIRUBAKARAN, S. I.; BEGUM, S. M.; ULAGANATHAN, K. and SAKTHIVEL, N. "Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat," **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 46, p. 918-927. 2008.

KOVTUN, Y.; CHIU, W.; TENA, G.; SHEEN, J. From the Cover: Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 97, p. 2940-2945, 2000.

LARSEN, K.L. & WINTHER, J.R., Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat, and proteases. **FEBS Letters**. v. 488, p.145-148, 2001.

LASCOMBE, M. B.; BAKAN, B.; BUHOT, N.; MARION, D.; BLEIN, J. P.; LARUE, V.; LAMB, C., and PRANGE, T. The structure of "Defective in Induced Resistance" protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. **Protein Science**. v. 17, p.1522-1530, 2008.

LEE H.I.; LEON J.; RASKIN I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. Proceedings of National Academy of Sciences of the USA, v.92, p. 4076-4079, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.

LIU, K.; JIANG, H.; MOORE, S.L.; WATKINS, C.B. & JAHN, M.M. Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. **Planta**. v. 223, p. 672-683, 2006.

MALDONADO, A.M.; DOERNER, P.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J. & CAMERON, R.K. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in Arabidopsis. **Nature** v. 419, p. 399-403, 2002.

MALECK, K., DIETRICH, RA .Defense on multiple fronts: How do plants COPE with diverse enemies? **Trends Plant in Science**. v. 4, p. 215-219,1999.

MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE M.; *et al.*, CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins, **Nucleic Acids Research**, v. 39 ,p. 225-229, 2011.

McDOWELL, J.M., DANGL, J.L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 25, p. 79-82, 2000.

MEDEIROS, E.S. & GIMARÃES, E.F. Piperaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo v. 25, p. 227-252, 2007.

MOLINA, A.; SEGURA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens, **FEBS Letters**. v. 316, p 119–122,1993.

MOLINA, A. & GARCIA-OLMEDO, F., . Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. **The Plant Journal**. v. 12, p. 669-675, 1997.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Plant Science**. v.9, p. 97-104, 2004.

NASCIMENTO, S. B. **Piper tuberculatum Jacq.: PROSPECÇÃO DE GENES E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM POTENCIAL USO NO MELHORAMENTO GENÉTICO**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2009. 90p.

NASCIMENTO,S.B.; CASCARDO, J.C.M.; DE MENEZES, I.C.; DUARTE, M.L.R.; DARNET, S. H.; HARADA, M.L.; DE SOUZA, C.R.B. Identifying sequences potentially related to resistance response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by suppression subtractive hybridization. **Protein & Peptide Letters**. v.12, p.1429-1434, 2009.

NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT III, B.F., DANGL, J.L. Recognition and response in

the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, v.37, p. 579- 609, 2003.

NISHIMURA, S.; TATANO, S.; GOMI, K.; OHTANI, K.; FUKUMOTO, T.; AKIMITSU, K. Chloroplast-localized nonspecific lipid transfer protein with anti-fungal activity from rough lemon, **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 72, p. 134-140, 2008.

OKAGIMA, H. Colheita, produção, beneficiamento e mercado externo de pimenta-do-reino. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇU, 1., 1996, Belém, PA. Anais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; JICA, p.287-295. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89),1997.

PADOVAN, L.; SCOCCHI, M. and TOSSI, A. Structural Aspects of Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein and Peptides Science**, v. 11, p. 210-219, 2010.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. **Hospedeiro: mecanismos de resistência**. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIN, L. (eds.) Manual de Fitopatologia – princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.I. M. . The role of lectins in plant defense. **Histochemical Journal**. 27 (4): 235-271.1995.

RAMIREZ-MEDELES, M.D.C., AGUILAR, M. B., MIGUEL, R. N., BOLAÑOS-GARCIA, V. M., GARCIA-HERNANDEZ, E., SORIANO-GARCIA, M. Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*. **Archives of Biochemistry Biophysics**. v. 415, p. 24–33, 2003.

REALE, GIOVANNI. **Metafísica de Aristóteles**. Volume 1,2 e 3. São Paulo: Loyola, 2001.

REGENTE, M.C., GIUDICI, A.M., VILLALAIN, J. & LA CANAL, L. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. **Letters in Applied Microbiology**. v. 40, p.183-189, 2005.

REIGNAULT, P. & SANCHOLLE, M., . Plant-Pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? **Comptes Rendus Biologies**. v. 328, p. 821-833, 2005.

RYALS, J. A .; NEUENSHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A .; STREINER, H. Y.;HUNT, M.D. Systemid acquired resistance. **Plant Cell**, p.1809-1819,1996.

SAMUEL, D., LIU, Y-J., CHENG, C-S. & LYU, P-C. Solution structure of plant non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 35267–35273, 2002.

SEGURA, A.; MORENO, M.; GARCIA-OLMEDO,F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach, **FEBS Letters**. v.332, p. 243–246,1993.

SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B.M. A., CAMMUE, B.P. A. & De BOLLE, M.F.C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 46, p. 941-50, 2008.

SILVA, E.M. J. & S.R. MACHADO *Revista Brasileira de Botânica* v. 22, p.117-24, 1999.

STEIN, R. L. B. et. al. **A cultura da pimenta-do-reino**. Brasília: Embrapa SPI, 1995. 58p. (coleção plantar, 21).

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B. & MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Plant of Pathology**. v.35, p. 235–270, 1997.

SUN, J.Y.; GAUDET, D.A.; LU, Z.X.; FRICK, M.; PUCHALSKI, B.; LAROCHE, A. Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins, **Molecular Plant - Microbe Interactions**. v. 21, p. 346–360, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. São Paulo: Artmed, 2009.

TEBBS, M.C. Revision of Piper (Piperaceae) in the New World 3. Taxonomy of Piper sections Lepianthes and Radula. **Bulletin of the Natural History Museum**, Botany series 23: p.1-50, 1993.

THOMA, S., HECHT, U., KIPPERS, A., BOTELLA, J., De VRIES, S. E SOMERVILLE, C., Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. 105:35-45, 1994.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TON, J., VAN PELT, J.A., VAN LOON, L.C. PIETERSE, C.M. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.15, p.27-34, 2002.

VALUEVA, TA, MOSOLOV, V.V. . Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**. v. 69, p.1305-1309, 2004.

VAN LOON, L. C. REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**. v.44, p.135-162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**. New York, v. 40, p. 199-211, 1970.

VAN LOON, L.C. Occurrence and Properties of Plant Pathogenesis-Related Proteins In: DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S (eds.). Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, 1999.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, Th.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.12, p. 245-264, 1994.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**. v. 44, p.135-162. 2006.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 55, p. 85–97, 1999.

WANG, S.Y.; WU, J.H., NG, T.B., YE, X.Y., RAO, R.F. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from mung bean. **Peptides**. v. 25, p.1235-1242, 2004.

WANG, C.; XIE, W.; CHI, F.; HU, W.; MAO, G.;SUN, D.; LI, C. and SUN, Y. BcLTP, novel lipid transfer protein in *Brassica chinesis*, may secrete and combine extracellular CaM. **Plant Cell Reports**. v. 27, p 159-169, 2008.

WANG, C.; YANG, C.; GAO, C. and WANG, Y. Cloning and expression analysis of 14 lipid transfer protein genes from *Tamarix hispida* responding to different abiotic stresses. **Tree Physiology**. v. 29, p. 1607-1619, 2009.

YANG, X., LI, J., LI, X. & PEI, Y. Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. **Peptides**. v. 27, p. 3122-3128, 2006.

YANG, X.; WANG, X.; LI, X.; ZHANG, B.; XIAO, Y.; LI, D.; XIE, C.; PEI, Y. Characterization and expression of an nsLTPs-like antimicrobial protein gene from motherwort (*Leonurus japonicus*), **Physiology and biochemistry**, v. 27, p. 759-766, 2008.

YUNCKER, T.G. New species of Piperaceae from Brazil. Boletim do Instituto de Botânica v. 3: p. 1-370, 1966.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil I: Piper -Group I, II, III, IV. **Hoehnea**. v. 2, p. 19-366, 1972.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil II: Piper:Group V; Ottonia; Pothomorphe; Sarcorhachis.**Hoehnea** v. 3, p. 29-284, 1973.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil III: Peperomia; taxa of uncertain status. **Hoehnea** v. 4, p. 71-413, 1974.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae – family profile. **Brittonia** v.10, p. 1-7, 1958.

ZAMAN, U. and ABBASI, A. "Isolation, purification and characterization of a nonspecific lipid transfer protein from *Cuminum cyminum*." **Phytochemistry**, vol. 70, p. 979-987, 2009.

ZEVEN, A.C. **Black pepper, *Piper nigrum* (pipereceae)**. In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). Evolution of crop plants. New York: Logman, 1974.

ZOTTICH, U.; CUNHA, M. Da; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; SILVA, N. C.M.; SANTOS, I.S.; NASCIMENTO, V.V.; MIGUEL, E. C.; MACHADO, O. L.; GOMES, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amilase inhibitor properties, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1810, p. 375-383, 2011.

ANEXO A – Tabela de aminoácidos

Abreviatura		Nome do Aminoácido
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina