



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

**PROTEÍNA PR-4 DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.):
EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA BACTERIANO E AVALIAÇÃO
FUNCIONAL**

DIEHGO TULOZA DA SILVA

**BELÉM-PA
2015**



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

**PROTEÍNA PR-4 DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.):
EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA BACTERIANO E AVALIAÇÃO
FUNCIONAL**

DIEHGO TULOZA DA SILVA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

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

**BELÉM-PA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

da Silva, Diehgo Tuloza, 1985-

Proteína pr-4 de pimenteira-do-reino (*piper nigrum*
l.): expressão heteróloga em sistema bacteriano e
avaliação funcional / Diehgo Tuloza da Silva. - 2015.

Orientadora: Cláudia De Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências
Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Pimenta do reino - Doenças e pragas. 2.
Bactérias - Genética. 3. Fungos fitopatogênicos.
I. Título.

CDD 23. ed. 583.25



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

**PROTEÍNA PR-4 DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.):
EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA BACTERIANO E AVALIAÇÃO
FUNCIONAL**

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof.^a Dr.^a Maria Elena Crespo López
(ICB/UFPA – Membro)

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

**BELÉM-PA
2015**

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS



Universidade Federal do Pará – UFPA;



*Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico*

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico – CNPq;**



**Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia
Celular – PPGBM;**



Fundação Amazônia Paraense

DEDICATÓRIA

Dedico à Euriana Tuloza, minha mãe, pelo amor e apoio incondicionais dados a mim;

Edison R. Matos, responsável em parte, pela pessoa que sou.

Aline Medeiros Lima, minha namorada, companheira, confidente e, acima de tudo, pela mulher impar que és;

A minha Avô, Erandi Lima Tuloza (In memoria);

A minha tia Eliana Tuloza (In memoria).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará que, através do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, possibilitou a realização da minha pós-graduação.

Pela bolsa de estudo ofertada agradeço ao CNPq e, juntamente com, a FAPESPA e CAPES o apoio financeiro do projeto de pesquisa.

Ao Corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

A secretaria do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, em especial a Socorro Andrade.

A minha orientadora Dr^a. Cláudia Regina Batista de Souza, pela confiança e apoio.

Aos docente do Laboratório de Biologia Molecular (Labiomol). Professoras Maria Lucia Harada e Margarida Maria e Professor Nilson Praia Anselmo.

Aos professores Agenor Santos e Maria Elena Crespo López, pelas contribuições dadas.

A todos os membros que compõe o Labiomol. Alunos de Iniciação científica, Mestrado, Doutorado, a todos muito obrigado.

Aos meus companheiros de jornada no Labiomol, que nesse periodo foram tantos, Jairo, Vinicius, Mauro, Deivid, Fabiano, Nicolle e em especial Sávio Reis.

Aos amigos Marcela Nunes Videira, Jonas Gonzaga, José Alvarez Junior, Igor Braga, e a todos que fizeram parte dessa historia.

A todo minha família. Tias, ou melhor, minhas mães, meus tios, primos e primas. E a todos aqueles que pela memoria combalida do autor não foram citados, os meus profundos e sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Interação dos seres vivos com o meio ambiente	11
1.2 Interação planta-patógeno	13
1.3 Proteínas PR	17
1.4 Proteína PR-4	20
1.5 A fusariose da pimenteira-do-reino	22
1.6 PR-4 da Pimenteira-do-reino	24
1.7 Expressão heteróloga em sistema bacteriano	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Clones contendo a seqüência de cDNA da PnPR-4	29
3.2 Construção do vetor pET29a-PnPR-4	29
3.3 Indução da expressão	30
3.4 Obtenção do extrato protéico bacteriano total	31
3.5 Análise em SDS-PAGE	31
3.6 Atividade de quitinase da PnPR4	32
3.6.1 Acetilação da Glicol Quitosana	32
3.6.2 SDS-PAGE para atividade de quitinase da PnPR4	33
3.6.3 Tratamentos utilizados na atividade de quitinase da PnPR-4	33
3.6.4 Atividade de quitinase da PnPR4 após SDS-PAGE	34
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	35
4.1 Expressão da Proteína Recombinante PnPR-4	35
4.2 Avaliação da atividade da PnPR-4	40
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Célula vegetal infectada por patógenos de todas as classes; Em (1) a célula reconhece os PAMPs através dos PRR extracelulares ativando a PTI; Em (2) mostra a capacidade que os patógenos possuem de secretar proteínas efetoras no citoplasma da célula inativando a resposta PTI (3); Intracelular NLRs percebem as moléculas efetoras por três vias: Através da ligação direta entre a molécula efetora e o receptor (4a); Através da modificação da proteína efetora por uma molécula *Decoy* (Isca) que é reconhecida pelo receptor somente quando sofre a mudança (4b); através do reconhecimento da molécula efetora mediada pela alteração de um alvo de virulência hospedeiro, tal como a de um domínio citosólico, PRR (4c); cada um desses três processos de reconhecimento desencadeia a ETI (5). Fonte: Adaptado de Dangl *et al.* 2013 16
- Figura 2. Representação esquemática das classes I e II das proteínas PR-4, evidenciando suas características, quanto aos domínios presentes em cada classe. Fonte: Adaptado de Lu *et al.* (2012).....21
- Figura 3. Exemplar de *P. nigrum* L. (Pimenteira-do-reino) (a); *P. nigrum* L. infectada por *F. solani* f. sp. *piperis* (b). Fonte: Nascimento, 2009.....23
- Figura 4: Alinhamento da proteína PnPR-4 com proteínas PR-4 de outras espécies de plantas. As proteínas PR-4 usadas para o alinhamento são: *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis* BrPR4 (AAN23106.2); *Sambucus nigra* SnPR4 (CAA87070.1); *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* AlPR4 (XP_002884463.1) e *Lycoris radiata* LrPR4 (ACI31201.1). Fonte: Tavares, 2012.....25
- Figura 5. SDS-PAGE dos extratos protéicos total de células (*E. coli* Rosetta (DE3)) transformadas com a construção plasmidial (pET29a+PnPR-4), com expressão induzida nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h, e vetor vazio controle negativo (CTR-). Ambos foram induzidas com IPTG (1mM). M = marcador de massa molecular (kDa). Seta (←): posição referente à proteína recombinante PnPR-4. Observar banda diferencial, quando comparado com o CTR-, no extrato protéico de células com o vetor recombinante, a mais intensa ocorreu em 5 horas de indução.....35
- Figura 6. Esquema da construção pET-29a-PnPR-4. Na parte superior estão destacadas a ORF em verde, a cauda de histidina em rosa e os sítios para enzimas *Nde*I e *Xho*I...37
- Figura 7. Sistema pET de expressão de proteínas. (A) A expressão do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7 presente no genoma da *E. coli* não é produzido devido a ausência de IPTG no meio e não ocorrendo a transcrição do gene correspondente a PnPR-4. (B) A expressão do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7 é produzida devido a presença do IPTG no meio e uma vez sintetizada a enzima reconhece o promotor T7 presente no plasmídeo pET e transcreve o gene da PnPR-4.39
- Figura 8. Acetilação da glicol quitosana. Observar do lado esquerdo e direito as fórmulas estruturais da glicol quitosana e glicol quitina, respectivamente. Destaque para

a ligação β 1 \rightarrow 4 da glicol quitina, que é o sítio de clivagem de quitinases que usam este polímero como substrato.....40

Figura 9. Atividade de quitinase da PnPR-4 em meio ácido (pH: 5.0) após SDS-PAGE. As colunas 1 e 2 são, respectivamente, amostras de extratos protéicos total sem (1) e com a PnPR-4 (2). O gel com os tratamentos 1 e 2 foi corado com azul de comassie e visualizado sob luz branca. M: Marcador de massa molecular em kDa. As colunas 3, 4, 5, 6 são tratamento dos extratos protéicos total sem (3 e 5) e com PnPR-4 (4 e 6). O gel com os tratamentos 3, 4, 5, 6 foi corado com Calcofluor White e visualizado sob luz UV. Notar as zonas líticas na mesma posição em que se encontra a PnPR-4 da coluna 2 e a atividade da PnPR-4 mesmo em condições desnaturantes. β m: β -mercaptoetanol, 100°C: fervura. Todas as colunas ímpares representam o controle negativo.....41

Figura 10. Atividade de quitinase da PnPR-4 em meio Básico (pH: 7.8) após SDS-PAGE. As colunas 1 e 2 são, respectivamente, tratamentos dos extratos protéicos total sem (1) e com a PnPR-4 (2). O gel com as amostra 1 e 2 foi corado com azul de comassie e visualizado sob luz branca. As colunas 7 e 8 são tratamentos dos extratos protéicos total sem (7) e com (8) a PnPR-4. O gel com essas amostras foi corado com Calcofluor White e visualizado na luz UV, a zona lítica é observada na amostra 8 no mesmo local da PnPR-4 da amostra 2 no gel corado com azul de comassie.42

Figura 11. Visão geral da atividade de quitinase em meio ácido e básico. Notar a atividade da PnPR-4, tanto no meio ácido (pH: 5.0) quanto no meio básico (pH: 7.8), pelas zonas líticas formadas PnPR-4. Observar também a zona lítica mais intensa de PnPR-4 no meio ácido. Todas as colunas ímpares são de controle negativo, e todas as colunas pares são de extratos com a PnPR-4. M: Marcador de massa molecular em KDa43

RESUMO

Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR) são induzidas em resposta ao ataque de patógenos. Proteínas PR são agrupadas em 17 famílias, PR-1 a PR-17. Atividades antifúngicas e enzimáticas foram descritas para algumas dessas proteínas. Entre elas, a família PR-4 compõe as classes I e II de quitinases de plantas. Um clone de cDNA que codifica uma PR-4 da classe II, nomeada PnPR-4, foi isolado, em estudos anteriores, de *Piper nigrum* L. (pimenteira do reino). Esta é uma importante cultura para Brasil, principalmente no estado do Pará, no entanto sua produção tem diminuído devido à doença conhecida como podridão da raiz (Fusariose) causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. Neste trabalho, o cDNA da PnPR-4 foi usado para a produção da proteína recombinante, chamada de PnPR-4. O quadro de leitura aberta (ORF) da PnPR-4, foi amplificado por meio de ensaio de PCR e, em seguida a ORF foi ligada ao vetor de expressão pET-29(a) e introduzido, por eletroporação, em *E. coli* Rosetta (DE3). Nas células transformadas, a produção da proteína de interesse foi induzida por IPTG 1mM à 37°C por 5h. Após a produção, a atividade enzimática da proteína recombinante PnPR-4 foi avaliada pela detecção da atividade enzimática de quitinase em gel de poliacrilamida após eletroforese. A atividade foi avaliada em pH: 5.0 e pH:7.8 para demonstra a estabilidade da proteína recombinante. A massa molecular da PnPR-4 foi de 13.5 kDa, estando de acordo com outras PR-4 produzidas pelo sistema de expressão heteróloga em sistema bacteriano. No ensaio de atividade enzimática, a PnPR-4 apresentou atividade quitinolítica, tanto em pH:5.0 ou pH:7.8. Esta é uma característica de chitinases de plantas, atividade em uma ampla faixa de pHs. Onde, a atividade ótima ocorre entre pH: 3.0 e 5.0. Na proteína recombinante, o pH ótimo foi 5.0, no entanto ela teve atividade em pH 7.8, demonstrando a estabilidade da enzima. Estes resultados mostram que o sistema bacteriano de expressão heteróloga é eficaz para a produção da proteína recombinante PnPR-4, que é uma enzima com atividade quitinolítica e altamente estável. Assim, a PnPR-4 é uma nova enzima que pode ser usado em biotecnologia vegetal no combate contra fungos patogênicos da planta.

Palavras chave: Pimenteira do Reino , PnPR-4, Proteína Recombinante, Quitinase, PR-4.

ABSTRACT

Pathogenesis-related (PR) proteins are plant proteins that are induced in response to pathogen attack. PR proteins are grouped into 17 independent families, PR-1 to PR-17. Antifungal and enzymatic activities have been described for some of these proteins. Among them, the PR-4 family comprises class I and II of plant chitinases. cDNA clone that encode a PR-4 of the class II, designated as PnPR-4, was previously isolated, in others studies, from *Piper nigrum* L. (black pepper). This is an important crop for Brazil, mainly in Pará state, however its production has decreased because root rot (Fusariose) disease caused by fungus *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. In this study, PnPR-4 cDNA clone was used for production of the recombinant protein, named PnPR-4, by bacterial expression system. Open Read Frame (ORF) of the PnPR-4 protein, was amplified from the cDNA clone by PCR assays, then ORF was linked in the expression vector pET-29(a) and introduced, by eletroporation, into *E. coli* Rosetta (DE3). The production of target protein, in transformed cells, was induced by 1 mM IPTG, at 37°C for 5h. After production, enzymatic activity of recombinant PnPR-4 was evaluated by Detection of Chitinase Activity after Gel Electrophoresis Polyacrylamide. Activity was evaluated in pH: 5.0 and pH: 7.8 for showing the stability of the recombinant protein. Molecular mass of Recombinant protein, PnPR-4, was 13.5kDa, according with others PR-4 produced by heterologous expression in bacterial system. In assay of enzymatic activity, PnPR-4 presented chitinolytic activity, both in pH: 5.0 or 7.8. This is a characteristic of plant quitinases, activity in a broad range of pHs. Where, optimal activity occurs between pH: 3.0 and 5.0. For PnPR-4, the optimal pH was 5.0, however in pH: 7.8 the recombinant protein had activity, demonstrating the stability of enzyme. These results showing that bacterial system of heterologous expression is effective for production of the recombinant protein PnPR-4, that it is an enzyme with chitinolytic activity and highly stable. Thus, PnPR-4, is now, a new enzyme which can be used in plant biotechnology in the combat against plant's pathogenic fungi.

Keywords: Black pepper, PnPR-4, Recombinant Protein, Chitinase, PR-4.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Interação dos seres vivos com o meio ambiente

Os seres vivos estão susceptíveis as alterações no seu ambiente, o que pode tornar desfavoráveis seu crescimento, desenvolvimento e, em alguns casos, sua sobrevivência. Dentre as causas prejudiciais está o ataque de organismos patogênicos como vírus, fungos e bactérias. Esse ataque, na maioria dos casos, é devastador no ambiente natural, apresentando um potencial de destruição ainda maior em organismos agricultáveis, como os vegetais.

Nas últimas décadas do século passado houve um aumento significativo da expansão agrícola em escala global (Foley *et al.*, 2011). Esse fato, no entanto, tem sido determinante nas mudanças ambientais observadas no planeta, neste cenário temos variações climáticas bruscas, perda de biodiversidade com o desmatamento de floresta e poluição das reservas de água doce, sendo esses fatores propícios para ataque de patógenos aos vegetais, implicando em perdas nas lavouras o que reflete no aumento do preço dos alimentos (Foley *et al.*, 2005; Godfray *et al.*, 2010; Lobell e Gourdjji, 2012).

Plantas e animais estão sujeitos ao estresse biótico, como o ataque por patógenos, e no caso de plantas, este tipo de estresse também pode ser causado por mamíferos, aves e insetos (De Vos *et al.*, 2005; Kliebenstein, 2012). Outro tipo de adversidade a qual os organismos estão susceptíveis são as intempéries climáticas, como variações bruscas na temperatura ou alterações na concentração de íons do solo, elevada concentração de sais e metais pesados, sendo esses designados de estresses abióticos, os quais causam perdas consideráveis, principalmente em plantas, sobretudo naquelas com potencial econômico (Xiong *et al.*, 2002; Xiong e Zhu, 2002).

Em vários grupos de animais como mamíferos, peixes, nematóides e insetos, o combate às adversidades decorrente do estresse é realizado por grupos de células que em conjunto formam o sistema imune (Aderem *et al.*, 2000; Khush *et al.*, 2000; Turvey *et al.*, 2010). Porém, entre estes organismos existem diferenças significativas, por exemplo, nos vertebrados o sistema imune é composto por grupos de células especializadas que constituem o sistema imune inato e o sistema imune adquirido (Medzhitov *et al.*, 2002; Mcguinness *et al.*, 2003).

Nos mamíferos a ativação do sistema imune inato é realizada por um repertório de células hematopoiéticas, como macrófagos e eosinófilos que em conjunto com receptores específicos presentes na membrana plasmática, como os *tool like receptors* (TLRs), detectam e combatem agentes patogênicos. O sistema imune adquirido atua através de células especializadas, como os linfócitos T e B. Essas células possuem a capacidade de geração e diferenciação de diversos e variados tipos de receptores celulares, tornando a resposta imunológica mais eficaz (Takeda *et al.*, 2003; Turvey *et al.*, 2010).

Nos animais, células especializadas atuam no combate à patógenos, debelando as causas decorrentes do estresse biótico. Outra característica fundamental é sua capacidade motora, possibilitando a fuga quando se vêm em condições de estresse (Iriti e Faoro, 2007). Esse padrão de defesa contra patógenos, encontrado nos animais, não ocorre nos vegetais, por serem sésseis e não possuindo um sistema de defesa organizado com células próprias (Nürnberger *et al.*, 2004).

O caráter sésseis dos vegetais talvez seja a característica mais marcante desse grupo de organismos. Assim, estão expostos a todos os tipos de estresse, ataque de patógenos, seca, alagamentos, salinidade, variações extremas de temperaturas, alterações na concentração de íons no solo e metais pesados (Timperio *et al.*, 2008; Ahuja *et al.*, 2010). Essas adversidades são devastadoras para a produção de alimentos, por causarem perdas econômicas consideráveis (Hashiguchi *et al.*, 2010).

Com toda essa gama de adversidades, como as plantas conseguem manter a sobrevivência? Como sobrevivem, por exemplo, às intempéries climáticas? Células especializadas como macrófagos e neutrófilos são a chave para ativação do sistema imune nos animais, mas não estão presentes nas plantas (Nürnberger *et al.*, 2004). Porém, apesar dessas diferenças, está estabelecido a ocorrência de um sistema de defesa nas plantas que apresenta similaridades com o sistema imune encontrado nos animais (Chisholm *et al.*, 2006; Jones e Dangl, 2006; Kliebenstein, 2012; Mengiste, 2012), sendo batizado por alguns autores de sistema imune inato ou imunidade basal de plantas (Medzhitov e Janeway, 1997; Boller e He, 2009).

As consequências decorrentes do estresse biótico são gravíssimas. Um exemplo atual desse problema pode ser observado na produção mundial de laranja, que vem acumulando perdas consideráveis na produção em escala mundial devido à doença causada por bactérias do gênero *Candidatu* (Gottwald, 2010). Quando se trata de região amazônica, outro exemplo de perdas decorrentes do estresse biótico pode ser observado

na produção de pimenta-do-reino, onde o fungo *F. Solani* f. sp. *piperis* ataca as plantações de *Piper nigrum* L. (pimenteira-do-reino) provocando a doença conhecida como fusariose, tornando a planta imprópria para a produção (Duarte *et al.*, 2002). Dessa forma, estudos envolvendo os mecanismos celulares e moleculares na defesa das plantas contra patógenos ganharam força nos últimos anos, devido à aplicação de técnicas de melhoramento em culturas de plantas com valor comercial (Dodds e Rathjen, 2010; Walters *et al.*, 2013).

1.2 Interação planta-patógeno

Na primeira metade do século passado foram lançadas as bases para o estudo em nível molecular envolvendo a defesa de plantas contra patógenos através dos trabalhos pioneiros de Harold Henry Flor, que propôs modelo gene - a - gene durante a interação planta – patógeno. Nessa interação observa-se que a resistência à doença requer a interação de dois genes complementares, um gene do patógeno chamado de gene de avirulência (*Avr*) e seu correspondente, que é ativado no hospedeiro, chamado de gene de resistência (*R*) (Flor, 1971; Hammond-kosack e Jones, 1997). Apesar do trabalho pioneiro de H.H. Flor, e com o avanço nas técnicas em biologia molecular, pesquisas posteriores revelaram que o sistema de defesa ativado na planta vai além da interação entre genes *Avr* e *R* presentes, respectivamente, no patógeno e planta (Schwessinger e Ronald, 2012).

Plantas estão em interação constante com microrganismos, principalmente no solo. No entanto, quando essa interação passa a ser danosa o microorganismo é considerado patogênico (Chisholm *et al.*, 2006). Dessa interação, surgiram pesquisas em nível celular e molecular que revelaram outros mecanismos de atuação do sistema imune, como por exemplo, no modelo zigzague e modelo de guarda, estes atuando de forma diferente ou complementar ao modelo proposto por Flor (Van der Hoorn *et al.*, 2002 ; Jones e Dangl, 2006).

Organismos multicelulares sob ataque de organismos patogênicos ativam, em nível celular, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Esses receptores estão presentes na membrana celular ou no citoplasma das células, fazendo parte do sistema imune (Nürnberger *et al.*, 2004). PRRs reconhecem moléculas do patógeno, conhecidas como *pathogen-associated molecular patterns* (padrões moleculares conservados associados à patógenos) (PAMPs) (Underhill e Ozinsky, 2002; Chisholm *et al.*, 2006).

Esse padrão de defesa é encontrado tanto em animais como em plantas, havendo a expressão de receptores de membrana, onde há domínios estruturais conservadas nos PRRs de ambos os grupos (Gómez-Gómez e Boller, 2000; Nürnberger *et al.*, 2004).

PAMPs são moléculas estruturais conservadas em microrganismos patogênicos, também conhecidas como epítetos específicos. Considerando sua estrutura molecular, a maioria dos epítetos pode ser dividida em polissacarídeos e polipeptídios. Os representantes mais conhecidos do primeiro grupo são Lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana das bactérias gram-negativas, peptídeoglicanos (PGN) encontrados na membrana celular das bactérias gram-negativas e gram-positivas, e quitina presente na parede celular de fungos (Liu *et al.*, 2013; Newman *et al.*, 2013).

Os principais polipeptídios são flagelina microbiana, proteína componente do flagelo de bactérias e fator Tu de alongamento, proteína envolvida na biossíntese da cadeia de aminoácidos pelos ribossomos bacterianos (Newman *et al.*, 2013). Como esses epítetos estão presentes também em microrganismos não patogênicos, é comum encontrar o termo MAMPs (Padrões moleculares associados a microrganismos) (Chisholm *et al.*, 2006; Boller e Felix, 2009).

PAMPs são estruturas essenciais para a sobrevivência dos microrganismos, estando presentes em organismos patogênicos, não patogênicos e saprófitos. Quando patogênicos, os PAMPs são reconhecidos pelo hospedeiro através de receptores localizados na célula vegetal (Ausubel, 2005; Jones e Dangl., 2006). Os PRRs das células vegetais estão localizados na membrana plasmática, apresentando dois tipos estruturais básicas, *receptors like Kinases* (RLKs) e *receptors Like Proteínas* (RLPs), ambos possuindo um domínio funcional modular (Zipfel, 2008)

O sistema imune vegetal apresenta dois níveis de defesa contra o ataque de organismos patogênicos. Durante o primeiro nível de defesa, a célula vegetal reconhece os PAMPs, através dos seus receptores de reconhecimento de padrão presentes na superfície celular, desencadeando a imunidade ativada por PAMP (*PAMPs-triggered immunity* - PTI) (Chisholm *et al.*, 2006). Sendo esta fase essencial para a ativação da imunidade inata nas plantas. Pois, há estudos demonstrando que plantas com mutações nos PRRs são susceptíveis a infecções microbianas (Zipfel, 2009).

Durante a imunidade ativada por PAMPs, os PRRs reconhecem domínios específicos presentes nos PAMPs, que frequentemente possuem função estrutural ou enzimática sendo essenciais para sobrevivência do patógeno. Genes que codificam PRRs para epítetos específicos como flagelina (flg 22) e fator Tu de alongamento

bacteriano, tem sido identificados em algumas espécies como FLS2 e ERF, respectivamente (Gomez-Gomez e Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2004; Robatzek *et al.*, 2007), onde FLS2 é um receptor do tipo *like Kinase* (RLK) com domínio extracelular de repetições ricas em leucina (*leucine-rich repeats* LRRs) e outro domínio citoplasmático do tipo serina/treonina kinase (Gomez-Gomez e Boller, 2000).

Se os receptores para os PAMPs são capazes de reconhecer e iniciar a defesa contra patógenos, como esses são capazes de infectar a planta? Patógenos apresentam mecanismos capazes de burlar ou superar as barreiras impostas pela primeira linha de defesa do sistema imune basal (Chisholm *et al.*, 2006), através da produção de moléculas capazes de ultrapassar a imunidade inata das plantas, se tornando virulentos e causando infecções. Essas moléculas, conhecidas como efetores de avirulência (*Avr*) ou elicitores, são tipos específicos de proteínas secretadas pelo patógeno diretamente no citoplasma da célula hospedeira interferindo na resposta imune (Hogenhout *et al.*, 2009).

Dentre os mecanismos usados pelos patógenos para infectar a planta, o melhor estabelecido é o utilizado pelas bactérias gram-negativas, conhecido como sistema de secreção do tipo III (*type III secretion system* – T3SS) (Chang *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2006), o qual a célula bacteriana utiliza durante a infecção para secretar proteínas efetoras no citoplasma da célula hospedeira. Esse mecanismo de infecção também pode ser observado em outros organismos patogênicos de plantas, como fungos e nematóides, sendo utilizadas outras estruturas para secretar proteínas efetoras (Catanzarit *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2008).

Uma vez que as barreiras da primeira linha de defesa são ultrapassadas, as plantas desenvolveram um mecanismo mais especializado para detectar e combater o ataque de microrganismos patogênicos, a imunidade desencadeada por efector (*effector triggered immunity* - ETI), que apresenta como principal característica a morte celular e necrose tecidual no local da infecção, esta conhecida como reação de hipersensibilidade (Chisholm *et al.*, 2006). Nessa fase, a efetividade do patógeno em conseguir secretar proteínas efetoras no citoplasma da célula é combatida por proteínas especializadas, que atuam como receptores conhecidas como proteínas de resistências, sendo essas proteínas expressas por genes conhecidos como genes de resistência ou genes R (Dangl e Jones, 2001) (Figura 1).

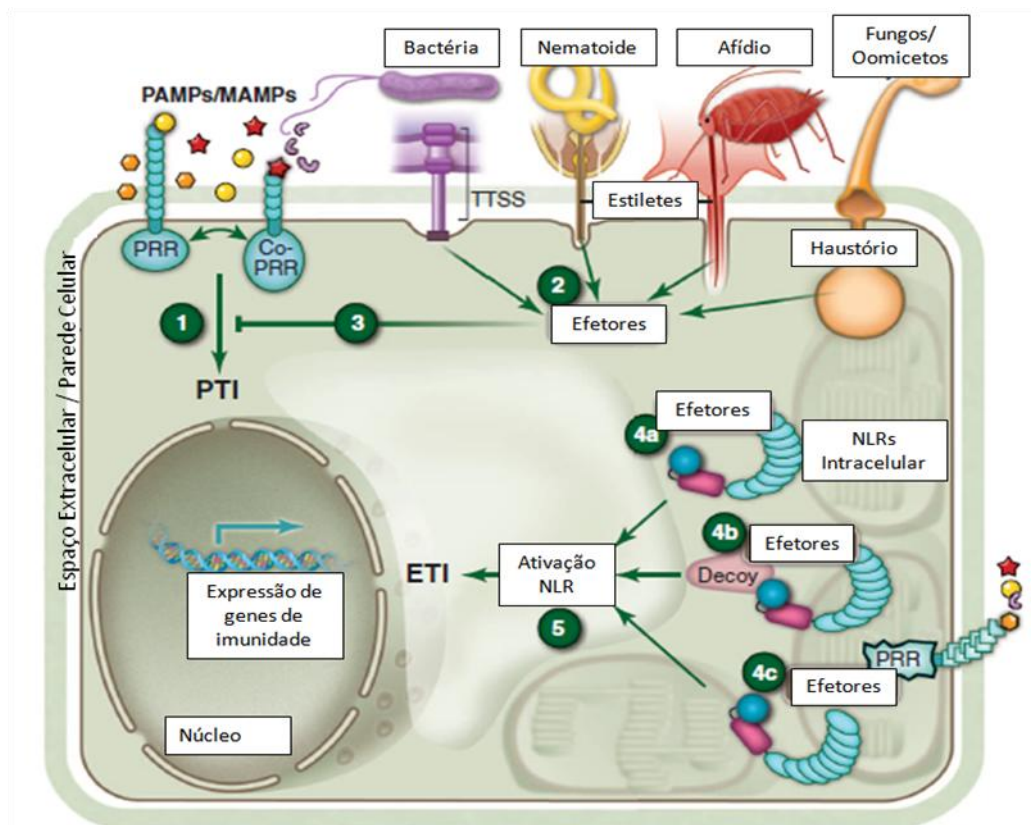


Figura 1: Célula vegetal infectada por patógenos de todas as classes; Em (1) a célula reconhece os PAMPs através dos PRR extracelulares ativando a PTI; Em (2) mostra a capacidade que os patógenos possuem de secretar proteínas efetoras no citoplasma da célula inativando a resposta PTI (3); Intracelular NLRs percebem as moléculas efetoras por três vias: Através da ligação direta entre a molécula efetora e o receptor (4a); Através da modificação da proteína efetora por uma molécula *Decoy* (Isca) que é reconhecida pelo receptor somente quando sofre a mudança (4b); através do reconhecimento da molécula efetora mediada pela alteração de um alvo de virulência hospedeiro, tal como a de um domínio citosólico, PRR (4c); cada um desses três processos de reconhecimento desencadeia a ETI (5). Adaptado de Dangl *et al.* 2013.

Genes R codificam receptores que são agrupadas em cinco classes ou famílias conforme a homologia de seus domínios protéicos (Dangl e Jones, 2001). A maioria desses receptores, com pelo menos três domínios principais, um domínio de repetições ricas em leucinas (*leucine-rich repeat*) (LRR) na região C-terminal, um domínio central conservado conhecido com *nucleotide binding site* (NBS) e um terceiro domínio na região N-terminal, domínio TIR, que apresenta homologia com o domínio citosólico dos receptores Toll de *Drosophila*, ou receptores de interleucina-1 dos mamíferos (*interleukin-1 receptors-TIR*). Receptores com esses três domínios são conhecidos como receptores TIR-NBS-LRR. Na região N-terminal, no lugar do domínio TIR, pode haver um domínio *coiled-coil* (CC), onde receptores com esse domínio são representados como CC-NBS-LRR, sendo um subconjunto de receptores com uma seqüência zíper de

leucina (LZ). As monocotiledôneas só possuem genes R que codificam receptores CC-NBS-LRR (Bai *et al.*, 2002; Mukhtar, 2013).

O desenvolvimento da doença, em plantas sob ataque de patógenos é, na maioria das vezes, um evento raro. Isso se deve a eficiência na resposta imune, que não se restringe apenas aos receptores, ativada tanto na PTI quanto ETI. Plantas sob stress biótico possuem vastos e variados mecanismos de defesa que incluem barreiras estruturais pré formadas, representadas principalmente pelo processo de lignificação da parede celular das plantas vasculares (Tobimatsu *et al.*, 2013). Outro mecanismo encontrado são as barreiras químicas pré formadas, estas representadas principalmente pelas Proteínas Relacionadas à Patogênese, conhecidas também como proteínas PR (Van Loon *et al.*, 2006; Padovan *et al.*, 2010; Kliebenstein, 2012), que são de grande interesse em programas de melhoramento genético vegetal (Wally e Punja, 2010).

1.3 Proteínas PR

As Proteínas PR foram identificadas pela primeira vez em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) infectadas pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV) (Van Loon e Van Kammen, 1970). Desde sua identificação e ao longo desses mais de 40 anos, várias proteínas relacionadas à patogênese vêm sendo descritas, onde até o presente momento há 17 famílias (PR-1 – PR-17) de PRs descritas e caracterizadas (Van Loon, 1985; Van Loon e Van Strien, 1999; Van Loon *et al.*, 2006).

A identificação de uma nova família é um processo longo e demorado devido a uma série de considerações que devem ser tomadas. Hoje, sabe-se que algumas proteínas PR são produzidas constitutivamente ou em condições de estresse abiótico (Yu *et al.*, 2001; Van Loon *et al.*, 2006). No entanto, Van Loon e Van Strien, 1999 postularam dois critérios básicos que devem ser tomadas para que novas famílias surjam e sejam consideradas como PRs. O primeiro postula que uma dada proteína deve ser produzida quando a planta está em condições de estresse biótico, não havendo ocorrência da proteína quando a planta está saudável. No segundo, a expressão da proteína deve ser demonstrada em pelo menos duas combinações diferentes de interação planta - patógeno. Esses critérios são válidos ainda hoje, daí a demora no surgimento de novas famílias mesmo com todos os avanços na pesquisa bioquímica e biologia molecular.

Agrupadas em 17 famílias e numeradas na ordem em que foram identificadas, as proteínas relacionadas à patogênese apresentam massa molecular variando entre 5 a 75 kDa, existindo dentro de cada família classes com isoformas básicas e ácidas (Gorjanović, 2009), são agrupadas em uma determinada família conforme suas características bioquímicas, como similaridade da sequência de aminoácidos, relações sorológicas e/ou atividades enzimática e biológica. Como características gerais, possuem estrutura compacta, geralmente estabilizada por ponte dissulfeto, são resistentes a proteólise e elevadas temperaturas, permanecendo solúveis mesmo em baixo pH (< 3), onde a maioria das outras proteínas de plantas são desnaturadas (Van Loon, 1999). A Tabela 1 apresenta todas as famílias e suas respectivas atividades.

Tabela 1: Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese.

Família	Membro tipo	Atividade
PR-1	Fumo PR-1 ^a	Desconhecida
PR-2	Fumo PR-2	β-1,3-glucanase
PR-3	Fumo P, Q	Quitinase I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Fumo ‘R’	Quitinase I e II
PR-5	Fumo S	Taumatina
PR-6	Tomate/Inibidor I	Inibidor de protease
PR-7	Tomate P ₆₉	Endoprotease
PR-8	Pepino/Quitinase	Quitinase III
PR-9	Fumo/Peroxidase	Peroxidase
PR-10	Salsa “PR1”	Ribonuclease
PR-11	Fumo/ Quitinase Classe V	Quitinase I
PR-12	Rabanete Rs-AFP3	Defensina
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Tionina
PR-14	Cevada LTP4	Transportadora de lipídeos
PR-15	Cevada OxOa	Oxalato oxidase
PR-16	Cevada OxOLP	“Oxalato-oxidase-like”
PR-17	Fumo PRp27	Desconhecida

Adaptado de Van Loon *et al.*, 2006

Diversas proteínas PR foram identificadas em diferentes gêneros e espécies de plantas, sendo descritas tanto em monocotiledôneas quanto dicotiledôneas (Van Loon *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007). Na célula vegetal pode ser encontrada em diferentes compartimentos, no entanto sua localização é frequentemente extracelular, confinada ao espaço intercelular ou apoplasto, local de maior acúmulo da proteína. Estão localizadas também no espaço vacuolar e citoplasma (Liu e Ekramoddoullah, 2006; Gorjanović, 2009).

Proteínas PR são freqüentemente sintetizadas com a sequência N-terminal que determina a translocação para o retículo endoplasmático, seguido pela secreção para o apoplasto. Podem também serem depositadas nos espaços vacuolares, com exceção dos membros da PR-10 que tem a localização confinada ao citoplasma (Liu e Ekramoddoullah, 2006; Van Loon *et al.*, 2006). Sua localização predominantemente extracelular está relacionada à proteção contra o ataque de patógenos e possíveis danos teciduais que esses possam causar (Anand *et al.*, 2004).

Desde que foram descritas pela primeira vez, várias proteínas PR foram isoladas e caracterizadas em diversas espécies (Sels *et al.*, 2008), havendo a determinação do tipo de atividade bioquímica e biológica que possuem. Bioquimicamente atuam como enzima, no caso de proteínas pertencentes ao grupo 3 e 4, que apresentam atividade de quitinase (Gomez *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006), e as pertencentes ao grupo 2 possuem atividade de glucanase (Hrmova *et al.*, 2002).

A atividade biológica se dá pela inibição do desenvolvimento de fungos patogênicos, através do ataque aos componentes da parede celular, quitina ou (1,3)- β -glucana (Leubner-Metzger e Meins, 1999; Bertini *et al.*, 2009). Atuam também em respostas ao estresse abiótico, como no caso das LTPs (PR-14) (Jung *et al.*, 2003), e em respostas a herbívoros, onde as PRs-12, conhecidas como defencinas, inibem enzimas digestivas, proteinases e α -amilase produzidas por insetos (Murad *et al.*, 2007).

Devido essas características as proteínas relacionadas à patogenicidade vêm se destacando em programas de melhoramento, visando à resistência ou tolerância de espécies vegetais contra o ataque de patógenos, principalmente fungos e bactérias (Wally e Punja, 2010). A eficácia das PR's no combate à patógenos pode ser observada em plantas como, Trigo, Cenoura, Arroz e Banana que foram geneticamente transformadas com genes que codificam proteínas PR's como, Quitinases, PR-14 e PR-5, onde todas essas PR's possuem propriedades antifúngicas (Liu *et al.*, 2012; Jayaraj e Punja, 2007; Shah *et al.*, 2013; Kovacs *et al.*, 2013).

Apesar da identificação e isolamento de varias PRs ao longo de mais de 40 anos (Ferreira *et al.*, 2007), os aspectos referentes aos mecanismos da regulação gênica, atividade referentes ao genes que codificam proteínas PR não são totalmente compreendidos, assim o estudo dos mecanismos de regulação abriram novos caminhos para emprego em programas de melhoramento vegetal (Sels *et al.*, 2008).

1.4 PR-4

A primeira descrição de uma proteína PR-4 ocorreu em *Solanum tuberosum* (batata) em 1989, foram nomeadas como *Win1 E Win2* (Stanford *et al.*, 1989) e, subsequentemente foram descritas em varias espécies como *Capsicum annuum* (pimenta), *Brassica sp.*, *Zea mays* (milho), *Malus domestica* (maçã) (Shin *et al.*, 2001; Ryang *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2013) dentre outras. Proteínas PR pertencentes à família 4 possuem características que as definem como quitinases do grupo I e II.

Definidas com Quitinases do tipo I e II, as PR-4 se destacam pela elevada capacidade inibitória de fungos fitopatogênicos de importância agrônômica, sendo que essa inibição é demonstrada tanto em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Bai *et al.*, 2013; Kovacs *et al.*, 2013). Assim, a PR-4 vem se destacando cada dia mais como uma molécula que apresenta reais condições de ser utilizada com o objetivo de combate a fitopatologias que causam que impactam diretamente na produção de alimentos.

Todas as proteínas PR-4 são reconhecidas pela presença do domínio BARWIN, que se caracteriza por ser altamente básico, possuir 125 aminoácidos, massa molecular de 13.7 KDa e seis resíduos de cisteína, esses responsáveis pela formação de três pontes de sulfeto, conferindo alta estabilidade a molécula (Wang *et al.*, 2011). Como a principal característica molecular das PR-4 é a presença do domínio BARWIN, o que as diferencia dentro da família PR4?

A principal diferença se dá pela presença de um domínio conservado na região N-terminal, encontrado apenas nas proteínas da classe I, conhecido como *chitin-binding domains* (domínio de ligação à quitina) (Van Loon *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2012). Como esse domínio apresenta alta homologia com o *hevein domain*, identificado em uma proteína com propriedades antifúngicas extraída de seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Van Parijs *et al.*, 1991), é comum as PR-4 pertencentes ao grupo I serem também reconhecidas como *hevein/chitin-binding domain* (ChtBD) (Figura 2) (Lu *et al.*, 2012).

As propriedades moleculares e bioquímicas das PR-4 lhes incluem dentro da classe de enzima quitinase. Essa inclusão se deve a inibição *in vitro* de fungos patogênicos (Hejgaard *et al.*, 1992; Ponstein *et al.*, 1994; Caruso *et al.*, 1996). Estudos posteriores revelaram também outras propriedades enzimáticas das PR-4, a de nucleases, tanto RNase, quanto DNase (Caporale *et al.*, 2004; Guevara-Morato *et al.*, 2010). De todas essas atividades a que desperta mais interesse, sem dúvida, é a de

quitinase, muito devido à inibição de fungos patogênicos *in vitro* com interesse agrônomico. Essa inibição é atribuída à degradação da quitina presente na parede celular.

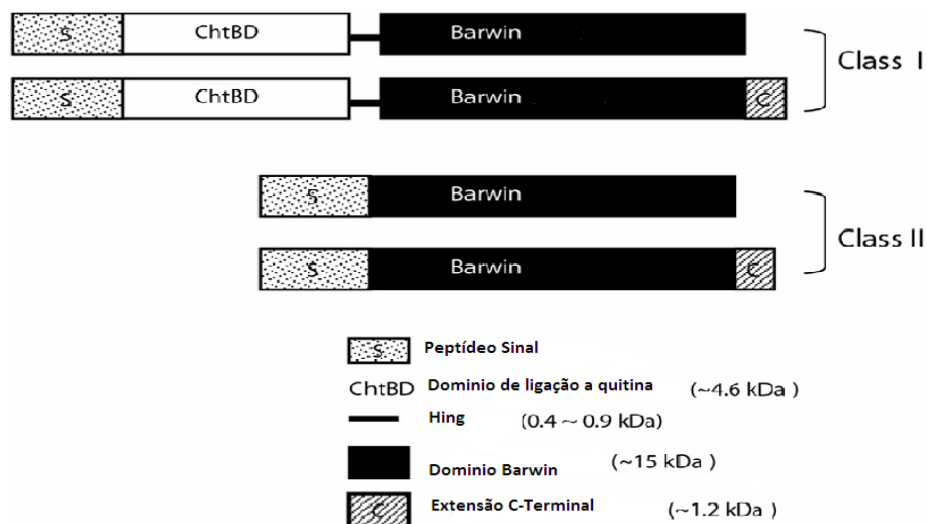


Figura 2: Representação esquemática das classes I e II das proteínas PR-4, evidenciando suas características, quanto aos domínios presentes em cada classe. Adaptado de Lu *et al.* (2012).

A quitina (β (1 \rightarrow 4) – linked *N*-acetyl-D-glucosamine) é um polissacarídeo presente em diversos grupos de seres vivos. Apresentam papel estrutural na parede celular de fungos, bem como na cutícula de artrópodes, como insetos e crustáceos (Aam *et al.*, 2010). No entanto, apesar da vasta distribuição entre os seres vivos, esse polímero não está presente em plantas superiores e mamíferos, onde esses produzem apenas enzimas conhecidas como quitinases, responsáveis pela degradação da quitina (Neuhaus, 1999).

As quitinases são produzidas por vários grupos de organismos, incluindo, bactérias, insetos, fungos, plantas e mamíferos, apresentando diferentes e variadas funções como nutrição, morfogênese e defesa (Adrangi *et al.*, 2010). A produção dessas enzimas em plantas é importante no combate a fungos causadores de doenças em plantas cultivadas (Taira *et al.*, 2002). No caso de plantas, quitinases representam um importante mecanismo de defesa contra fungos e insetos, que causam perdas consideráveis em plantas cultivadas (Herrera-Estrella e ChetZ, 1999).

Baseadas na similaridade da sequência de seus aminoácidos, estrutura, especificidade do substrato e mecanismos de catálise, as quitinases de plantas são divididas em sete classes, I-VII (Arie *et al.*, 2000; Sarma *et al.*, 2012). Algumas dessas classes são produzidas constitutivamente pela planta, principalmente em órgãos não vegetativos (Neale *et al.*, 1990; Takakura *et al.*, 2000), no entanto, a indução da expressão de classes em resposta ao stress biótico, principalmente causada por fungos patogênicos, recebe mais interesse devido ao potencial uso dessas moléculas em programas de melhoramento genético.

A efetividade das quitinases no combate a fungos patogênicos é demonstrada pela resistência nas plantas, que por meio da transgenia, expressão genes que codificam quitinases (Shin *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013; Kovacs *et al.*, 2013). Assim a identificação de genes que codificam essas enzimas e sua, conseqüente caracterização concernentes a propriedades bioquímicas e mecanismos de catálise são vitais para o combate de fungos que causam danos, não só econômicos, mas, sobretudo, sociais e ambientais (Cletus *et al.*, 2013).

1.5 A fusariose da pimenteira-do-reino

Fusarium é um gênero cosmopolita de fungos filamentosos formando colônias que se caracterizam pelo crescimento rápido com padrão de coloração esbranquiçada ou colorida, crescem na forma de esporos, esses podendo ser de dois tipos: microconídios e macroconídios. Os microconídios são unicelulares e uninucleados, enquanto os macroconídios, geralmente são multicelulares, com cada célula apresentando um núcleo (Brown *et al.*, 2006).

Espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* ocorrem em escala global, algumas sendo parasitos de plantas, causando infecções em qualquer fase do desenvolvimento, desde a germinação das sementes até o desenvolvimento e amadurecimento dos tecidos vegetativos, dependendo da espécie parasitada. Esse processo se dá, principalmente, pela decomposição de substratos celulósicos da planta (Ma *et al.*, 2013) (Figura 3). A patogenicidade ao homem é rara, no entanto muitas espécies de *Fusarium* produzem toxinas que causam sérios danos à saúde humana (Desjardins e Proctor, 2007). No continente americano, as espécies *F. solani* e *F. oxysporum* são parasitos que causam perdas em diversas culturas, como cevada, soja, mamão e batata (D'Ippólito *et al.*, 2010).

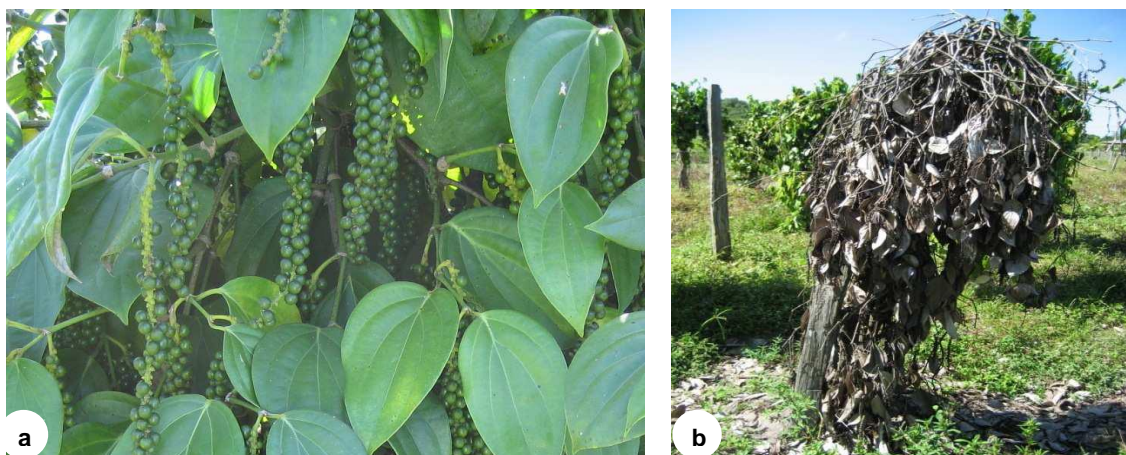


Figura 3: Exemplar de *P. nigrum* L. (Pimenteira-do-reino) (a); *P. nigrum* L. infectada por *F. solani* f. sp. *piperis* (b). Fonte: Nascimento, 2009

Na Amazônia, especialmente no Estado Pará, a espécie *F. solani* f. sp. *piperis* causa a doença conhecida como podridão das raízes ou fusariose, no qual o parasito ataca o sistema radicular da planta (Duarte *et al.*, 2002). Essa doença causa perdas na lavoura da ordem de 10 milhões de dólares anuais e redução de, aproximadamente, 3% da área cultivada anualmente, com uma produtividade média que já foi de 4,0 t/ha e, hoje, é de 2,0 t/ha (Tremacoldi, 2010).

O Estado do Pará é responsável por, aproximadamente, 70% da produção brasileira, que é de 41.376 t de pimenta seca, colhidas em 18.673 ha. Os estados do Espírito Santo, Bahia, Paraíba e Maranhão completam a produção brasileira (IBGE, 2015).

Uma das principais estratégias no combate a patógenos de plantas é o uso de defensivos químicos, no entanto essa prática é onerosa e danosa ao ambiente. Dessa forma, uma das alternativas ao uso desses defensivos é a busca por biomoléculas que confirmem resistência ou tolerância à planta. Neste sentido, para entender melhor esta interação planta-patógeno, de Souza *et al.* (2011) identificaram, por meio da metodologia de hibridização subtrativa por supressão (SSH), 87 cDNAs diferencialmente expressos em *P. nigrum* em resposta à infecção pelo *F. solani* f. sp. *piperis*. Grande parte das seqüências identificadas está associada com o sistema de defesa da planta. Entre elas, foi identificada uma seqüência parcial de uma proteína putativa do tipo PR-4, de acordo com as análises computacionais. Posteriormente, estudos realizados por Tavares (2012) possibilitaram o isolamento e a caracterização

molecular da seqüência de cDNA completa desta proteína PR-4. Essa caracterização é importante, pois a PR-4 pertence ao rol de moléculas com atividade antifúngica amplamente reconhecida, tornando-a com isso uma alternativa viável no combate a fusariose.

1.6 PR-4 da pimenteira-do-reino

Os estudos realizados por Tavares (2012) consistiram nos primeiros esforços para estudar a proteína PR-4 da pimenteira-do-reino, a qual foi denominada PnPR-4. Esta proteína deduzida a partir da seqüência de cDNA consiste de um polipeptídeo de 141 aminoácidos, com massa molecular e ponto isoelétrico preditos de 15.6 kDa e 8.71, respectivamente. Contudo, é provável que a proteína PnPR-4 seja sintetizada como uma proteína precursora maior e, após a clivagem do peptídeo sinal (1-21 aminoácidos) na extremidade N-terminal, resulte em uma proteína madura de 13.4 kDa e ponto isoelétrico de 8.64 (Tavares, 2012).

Análises computacionais comparativas utilizando o programa BLAST mostraram que a PnPR-4 exibe uma alta identidade (82%) com a proteína PR-4 de *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis* (Tavares, 2012). Na Figura 4 é mostrado o alinhamento da PnPR-4 com outras proteínas PR-4, onde seis resíduos de cisteína são conservados. A presença dessas cisteínas é uma característica conservada dessa família de proteínas importante para formação de três pontes dissulfeto, que garantem a alta estabilidade da proteína (Li *et al.*, 2010; Svensson *et al.*, 1992).

Análises *in silico* mostraram também que a proteína PnPR-4 pertence à classe II da família de proteínas PR-4 e tem uma localização extracelular devido a ausência do domínio de quitina e de uma extensão c-terminal envolvida no direcionamento da proteína para o vacúolo, indicando que sua localização fora do citoplasma, no apoplasto (Tavares, 2012).

Além dos dados moleculares da PnPR-4 obtidos por Tavares (2012), estudos adicionais envolvendo a análise funcional desta proteína são essenciais para elucidar o seu papel na interação da pimenteira-do-reino com o *F. solani* f. sp. *piperis*. Dentre as metodologias utilizadas para o estudo funcional de proteínas, a expressão heteróloga em sistema bacteriano, seguida da análise das atividades enzimáticas e biológicas da proteína recombinante, vem sendo empregada com sucesso para esta finalidade.

```

BrPR4      --MSRLSICLLVLLC--AFAAKTAAQS-ANVRATYHFYNPAQNGWDLYRVSAYCSTWDGN
LrPR4      MAMERVSLVI-VLLL--GLAAASFAQQASNVRATYNIYNPAQNNWDLNKVGAYCATWDAG
SnPR4      -----MCVLVFCVLLVGGGTAQSASNVRATYHIYNPQQINWDYNRASVYCATWDAN
PnPR4      --MARSALCLALLVL--ATFLCAEAQQASNVRATYHYYNPAQNGWDLNRVSAFCATWDAN
AlPR4      --MSRLSLCVFVLLC--AFAAKAAAQAPNVRATYHIYNPAQNNWDLYRVSAYCSTWDGN

BrPR4      QPLEWRQRYGWTAFCGPAGPRGRDSCGRCLRVNTNTGTQAQATVRIVDQCSNGGLDLDEAV
LrPR4      QPLWWRQKYGWTAFCEPVGPTGQASCEFCLLVTNQATGARQTVRIIDQCSNGGLDLDQGV
SnPR4      RPLEWRRRYGWTAFCEPVGPRGRDSCGFCLRVNTNTGTGTSQTVRIVDQCSANGGLDLEQGV
PnPR4      RPLSWRQRYGWTAFCEPVGPRGRDSCGFCLRVNTNTATNAGVTVRIVDQCSNGGLDLDWAV
AlPR4      QPLEWRQRYGWTAFCEPVGPRGRDSCGRCLRVNTNTATGTQAQATVRIVDQCSNGGLDLDEGV

BrPR4      FKQIDTDGQGYARGNLTNLYEFVNC--
LrPR4      FNQLDTNGQGYAQGHILTYSYQFVNC--
SnPR4      FQRLDTDGRGYARGNLTNLYQFVNCND
PnPR4      FNQIDTNGDGYXRGNLTNLYQFVNC--
AlPR4      FRQLDTNGQGNARGHLIVNYEFVNC--

```

Figura 4: Alinhamento da proteína PnPR-4 com proteínas PR-4 de outras espécies de plantas. As proteínas PR-4 usadas para o alinhamento são: *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis* BrPR4 (AAN23106.2); *Sambucus nigra* SnPR4 (CAA87070.1); *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* AlPR4 (XP_002884463.1) e *Lycoris radiata* LrPR4 (ACI31201.1). Fonte: Tavares, 2012.

1.7 Expressão heteróloga em sistema bacteriano

A produção de proteínas heterólogas através da tecnologia do DNA recombinante representa alto potencial para produção de proteínas de interesse comercial e tecnológico. Dentre os organismos utilizados para produção dessas proteínas, a bactéria gram negativa, *E. coli*, é um dos hospedeiros mais utilizados, pois está bem caracterizada geneticamente e possui elevada taxa de multiplicação (Brown, 2010).

A partir da década de 70 do século passado todos os ingredientes necessários para a manipulação do DNA recombinante já estavam disponíveis, que consistem em três componentes básicos: cortar, colar e copiar a seqüência de nucleotídeos de interesse (Watson, 2005). O primeiro passo para a produção da proteína recombinante é isolar ou cortar a seqüência ou gene de interesse. Esse isolamento é realizado por uma classe especial de enzimas isoladas de bactérias, conhecidas como enzimas de restrição, que reconhecem e clivam seqüências específicas de pares de bases do genoma de células eucariontes, possibilitando o isolamento do gene de interesse (Nelson e Cox, 2011).

Após o isolamento do gene de interesse, é necessária a escolha de uma molécula de DNA que possua a capacidade de auto-replicação, conhecida como vetor, no qual será inserida esta seqüência. Essa inserção é feita através da ligação das extremidades compatíveis do vetor com as extremidades do gene de interesse pela enzima DNA-ligase. Dos vetores disponíveis, o mais utilizado é o plasmídeo (Nelson e Cox, 2011).

No caso da produção de proteína heteróloga em sistema bacteriano, é necessário à utilização de um vetor de expressão. Esse deve possuir como principais características: a) uma origem de replicação, pois dependendo do vetor utilizado pode-se aumentar o número de cópias do gene de interesse; b) um promotor para transcrição, esse corresponde a uma seqüência de DNA que servirá como ponto de início para a transcrição do gene de interesse. Em *E. coli* o promotor é reconhecido pela subunidade σ da enzima de transcrição RNA polimerase. O promotor é uma das regiões mais importantes para a transcrição, pois controla a velocidade que o gene de interesse é transcrito. Ou seja, um promotor forte aumenta a taxa de produção de mRNA, e conseqüente a produção da proteína recombinante. Os principais promotores usados nos vetores de expressão são: *lac*, *trp*, T7 (Brown, 2010)

Diversos vetores se encontram disponíveis no mercado para expressão de proteínas recombinantes com ou sem fragmentos de fusão em *E. coli*. Dentre esses, temos os vetores da família pET (plasmid for expression by T7 RNA polimerase). Onde nessa família a expressão está sob o controle do promotor de transcrição $\Phi 10$ e dos sinais de iniciação de tradução *s10* da proteína do gene 10 do bacteriófago T7. A principal vantagem desse vetor é ele ser transcrito pela T7 RNA polimerase, que é muito seletiva e ativa, possuindo a capacidade de alongar cadeias de RNA aproximadamente 5 vezes mais rápida que a RNA polimerase de *E.coli*. Outra característica, é que alguns vetores da família pET apresentam o promotor T7-Lac, colocando a expressão da proteína sob o controle do repressor *lac*, reduzindo assim o *background* de expressão da proteína alvo na ausência do agente indutor (Novagen, 2006; Brown, 2010)

Outra característica fundamental dos vetores da família pET, é a presença de uma seqüência que codifica para seis resíduos de Histidina, formando uma seqüência conhecida como cauda de Histidina. Esses seis resíduos são fusionados à seqüência de aminoácidos de interesse formando complexos com íons de metais de transição, como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} . A formação desse complexo é essencial para a purificação de proteínas heterólogas em coluna contendo resina com íons metálicos bivalentes (Ni^{2+}),

pois as proteínas com a cauda são imobilizadas na resina devido a sua afinidade pelos íons (Novagen, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Produzir a proteína recombinante PnPR-4 por meio de expressão heteróloga em sistema bacteriano e avaliar a funcionalidade em condições *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos:

- Clonar e expressar a proteína recombinante PnPR-4 em sistema bacteriano;
- Produzir a Proteína recombinante em quantidade suficiente para avaliar sua atividade enzimática.
- Avaliar a proteína recombinante PnPR-4 quanto sua atividade enzimática de quitinase.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clones contendo a seqüência de cDNA da PnPR-4

Para a síntese da construção pET29a-PnPR-4 foi utilizada a seqüência de cDNA da PnPR-4 previamente isolada por Tavares (2012). Os clones bacterianos contendo esta seqüência, inserida no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega, USA), estão armazenados a -80° C no Laboratório de Biologia Molecular da UFPA.

3.2 Construção do vetor pET29a-PnPR-4

A seqüência de nucleotídeos da *ORF* (*Open Reading Frame*) correspondente a proteína PnPR-4 foi inserida no vetor de expressão, plasmídeo pET29a (Novagen, USA), nos sítios digeridos pelas enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, gerando a construção pET29a-PnPR-4.

Inicialmente a seqüência da *ORF* da proteína PnPR-4 foi amplificada a partir do clone de cDNA por meio de ensaios de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando-se os iniciadores contendo sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. A amplificação foi realizada em 30 ciclos no Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) sob as seguintes condições: Desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e alongação a 72°C por quatro minutos. O produto da PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% (P/V) corado com brometo de etídio e visualizado na luz ultravioleta. A purificação foi realizada com o *EZ-10 Spin Column PCR Product purification Kit* (Bio Basic Inc., Canadá), seguindo as orientações do fabricante.

Em seguida, foram montados os sistemas de digestão das amostras da *ORF* da PnPR-4 e do vetor pET29a com as enzimas de restrição *XhoI* (Jena Bioscience, Alemanha) e *NdeI* (Biolabs, Nova Inglaterra), de acordo orientações do fabricante. Para o vetor, a eficiência da digestão foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (P/V) corado com brometo de etídio comparando o padrão obtido com uma amostra do vetor pET29a não digerido, este sendo o controle negativo. Em seguida, as bandas correspondentes aos fragmentos de DNA de interesse foram purificadas a partir

do gel de agarose utilizando-se o *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research Corporation, USA), de acordo com as orientações do fabricante.

Por último, foi montado o sistema de ligação, onde os fragmentos de DNA da *ORF* e do vetor pET29a, ambos digeridos com *NdeI* e *XhoI*, foram ligados utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Biolabs, New England), de acordo com as orientações do fabricante. Em seguida, a construção pET29a-PnPR4 foi inserida na linhagem Rosetta (DE3) de *E. coli* por meio de eletroporação da seguinte forma: Em um tubo de 1,5 mL foram colocados 1 µL da ligação pET29a-PnPR-4 mais 50 µL de células Rosetta (DE3) competentes. Em seguida, essa mistura foi transferida para uma Cubeta e eletroporada a 1.7000 volts no *Electroporator 2510* (Eppendorf, Alemanha). Depois da eletroporação, foi adicionada à mistura 1 mL de meio LB com glicose (Caseína Hidrolisada 10% (P/V); Extrato de Levedura 5% (P/V); NaCl 10% (P/V); Glicose 20 mM) e, logo em seguida essa mistura transferida para um novo tubo de 1,5 mL e incubada a 37°C por uma hora. Após esse tempo, a cultura foi plaqueada em meio LB Agar (Caseína Hidrolisada 10% (P/V); Extrato de Levedura 5% (P/V); NaCl 10% (P/V); Agar 15% (P/V)) contendo os antibióticos Canamicina (30 µg/mL) e Cloranfenicol (34 µg/mL) e incubada a 37°C por quatorze horas.

3.3 Indução da expressão

Inicialmente, colônias de células transformantes foram inoculadas em novas placas contendo meio LB Agar com os antibióticos Canamicina (30 µg/mL) e Cloranfenicol (34 µg/mL) e incubados a 37°C por quatorze horas. No dia seguinte, uma colônia de células foi escolhida e inoculada em meio LB (Caseína Hidrolisada 10% (P/V); Extrato de Levedura 5% (P/V); NaCl 10% (P/V)) contendo os antibióticos Canamicina (30 µg/mL) e Cloranfenicol (34 µg/mL). Logo após a inoculação, o meio contendo as células foi incubado a 37°C sob agitação, leve e constante, por quatorze horas. Depois desse tempo, uma alíquota do inóculo foi diluído em meio LB (contendo os mesmos antibióticos) na proporção 1:100 (V/V) e incubado para crescimento até atingir a densidade óptica de aproximadamente 0.5 a 600 nm, o que levou cerca de 3 horas. Após esse tempo, foi realizada a indução da expressão adicionando-se à cultura IPTG (Isopropil-tio-β-D-galactosídeo) para a concentração final de 1 mM. Após a

adição do IPTG, a cultura foi incubada a 37°C sob leve agitação e, para avaliar o tempo ótimo de expressão da PnPR4, alíquotas de 1 mL da cultura foram coletadas nos tempo de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas de indução. Como controle negativo foi utilizado uma colônia de células transformantes com o vetor pET29a sem o inserto (vetor vazio), onde a eletroporação e a expressão foram realizadas sob as mesmas condições das células transformantes contendo a construção pET29a-PnPR4.

3.4 Obtenção do extrato protéico bacteriano total

A obtenção do extrato protéico foi realizada do mesmo modo, tanto para as seis alíquotas de cultura de células transformantes, quanto para o controle negativo. Após expressão, os clones transformantes e o controle negativo foram coletados por centrifugação a 8050g por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado tampão Tris-HCl 10mM (pH 8.0), repetindo-se a centrifugação a 8050g por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM,), após a ressuspensão das células foi adicionado Glicerol (C₃H₈O₃) e SDS (C₁₂H₂₅SO₄Na) nas concentrações finais de 4,2% (V/V) e 0,8% (P/V), respectivamente. A lise das células, para obtenção do extrato protéico, foi promovida por meio de procedimentos de congelamento (-20°C) por ½ hora /descongelamento (temperatura ambiente) por ½ hora repetido por cinco vezes. Após a lise, o material foi centrifugado a 8050g por 15 minutos com o objetivo de separar o extrato protéico (sobrenadante) do *debris* celular (sedimento). Por último, o extrato protéico foi coletado e armazenado a -20°C.

3.5 Análise em SDS-PAGE

Para análise do extrato protéico por SDS-PAGE foi utilizada a metodologia descrita por Laemmli (1970). Em uma alíquota de 12µL de extrato protéico total, tanto de células com o vetor recombinante quanto de células com o vetor sem inserto, foi adicionado 6 µL de tampão de amostra (240 mM Tris-HCl (pH 6.8); glicerol 30% (V/V); SDS 6% (P/V); 2,3M β-Mercaptoetanol; 0,006% azul de bromofenol (P/V)). Em seguida a amostra foi aquecida a 100°C (água fervente) por 5 minutos. Após o tratamento das amostras, a SDS-PAGE foi realizada em um gel de poliácridamida (70

mm x 90 mm x 1 mm) a 15% (P/V) contendo 0,1% de SDS (P/V), esse correspondente ao gel de corrida. Em seguida foi preparado o gel de empacotamento (10 mm x 90 mm x 1 mm) a 4% (P/V) de poliacrilamida, contendo 0,1% (P/V) de SDS. A PAGE foi realizada a 100 Volts por 2 horas. Após o termino da eletroforese o gel foi corado com uma solução de azul de Comassie (etanol 25% (V/V); Ácido acético 10% (V/V); Azul de Comassie (0,25% P/V)) por 24 horas. Passado esse tempo, o gel foi descorado em solução descorante (Acido acético 7,5 % (V/V), Etanol 25% (V/V)) e visualizada na luz branca.

3.6 Atividade de quitinase da PnPR4.

A atividade de quitinase da proteína PnPR-4 foi avaliada por meio de detecção na eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, descrita por Trudel e Asselin (1989), com algumas modificações como, a atividade quitinolítica foi realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico e, na atividade em meio básico o tampão de renaturação foi feito com TRIS-HCl pH:7.8. Para a atividade, primeiro foi preparada a glicol quitina, que atuou como substrato da enzima. O preparo do substrato foi feita a partir da acetilação da glicol quitosana, como descrito a seguir:

3.6.1 Acetilação da Glicol Quitosana

Em um Becker, foram diluídos sob constante agitação, 0,25 g de Glicol Quitosana liofilizada (Sigma-Aldrich, USA) em 5 mL de solução de Ácido Acético a 10% (V/V). Após a completa diluição, a agitação foi interrompida e a solução deixada na bancada *overnight* em temperatura ambiente (~ 28°C).

No dia seguinte foi adicionado à solução 22,5 mL de metanol, este foi adicionado lentamente. Após adição, a solução resultante foi filtrada em “Lã de vidro” e transferida para um novo Becker. Ao filtrado foi adicionado 0,375 mL de anidrido acético, e a solução ficou sob agitação por um minuto. Depois desse tempo, a agitação foi interrompida e a solução ficou na bancada por trinta minutos em temperatura ambiente. Após esse período a solução passou para o estado sólido, ou seja, formou-se em gel. Este foi cortado em pequenos pedaços com Bisturi previamente esterilizado.

Após a secção houve liberação de líquido, sendo este descartado. Em seguida os pedaços do gel foram transferidos para um Tubo Falcon de 50 mL e adicionou-se metanol num volume suficiente para apenas cobrir o gel. O Gel e o metanol foram homogeneizados no vortex por aproximadamente cinco minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 1350 g por quinze minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet gelatinoso que se formou, foi ressuscitado com etanol, aproximadamente num volume igual ao utilizado anteriormente para cobrir o gel. Em seguida foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições relatadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 25 mL de água deionizada autoclavada.

Como resultado da acetilação da glicol quitosana, foi obtida uma solução de glicol quitina (0,04% (P/V)), usada como substrato para atividade de quitinase da PnPR-4.

3.6.2 SDS-PAGE para atividade de quitinase da PnPR4

A atividade de quitinase da PnPR-4, foi realizada conforme a metodologia de Trudel e Asselin (1989). Inicialmente foi preparado um gel com as mesmas concentrações de poliacrilamida e SDS do gel de corrida do item 3.5, sendo que, a este gel, foi adicionado glicol quitina na concentração final de 0,01% (P/V). O gel de empacotamento e a PAGE foram realizados com as mesmas condições relatadas no item 3.5.

3.6.3 Tratamentos utilizados na atividade de quitinase da PnPR-4

Para a atividade, foram utilizadas amostras do extrato protéico total tanto de células com o vetor recombinante PnPR-4 e quanto de células com o vetor vazio. No total, oito (1 - 8) tratamentos foram utilizados, 4 correspondentes a amostras do extrato protéico total sem a PnPR-4 e, os outros 4, correspondentes a proteína recombinante: Em 12µL (volume usado para todos os tratamentos) de extrato protéico total do controle negativo e recombinante foi adicionado 6µL de tampão de amostra com as mesmas concentrações utilizadas no item 3.5., após a adição do tampão as amostras foram aquecidos a 100°C (água fervente) por cinco minutos. Essas amostras foram chamadas de 1 (CTR -) e 2 (PnPR-4). Em outras duas amostras de extrato protéico do controle negativo e proteína recombinante, amostras 3 e 4 respectivamente, foi adicionado 6µL de tampão de amostra (240 mM Tris-HCl (pH 6.8); glicerol 30% (V/V); SDS 6%

(W/V); 0,006% azul de bromofenol (W/V)). Às amostras 5 e 6, correspondentes, respectivamente, ao extrato protéico total do controle negativo e proteína recombinante, foi adicionado 6 μ L de tampão de amostra (240 mM Tris-HCl (pH 6.8); glicerol 30% (V/V); SDS 6% (W/V); 2,3M β -Mercaptoetanol; 0,006% azul de bromofenol (W/V)). Em seguida essas amostras foram aquecidas a 100°C. Por último, as amostras 7 e 8 correspondentes, respectivamente, ao extrato protéico total do controle negativo e a proteína recombinante, foi adicionado 6 μ L de tampão de amostra (240 mM Tris-HCl (pH 6.8); glicerol 30% (V/V); SDS 6% (W/V); 0,006% Azul de Bromofenol (W/V)). Todas as amostras, de 1 a 8, foram aplicadas no gel do item 3.6.2, e a PAGE foi realizada seguindo as mesmas descrições do item 3.5.

3.6.4 Atividade de quitinase da PnPR4 após SDS-PAGE

Após o termino da SDS-PAGE, o gel foi dividido em três partes. As amostras 1 e 2 foram coradas com solução Azul de comassie (Etanol 25% (V/V); Ácido acético 10% (V/V); Azul de Comassie (0,25% W/V)) por 24 horas. O gel com as amostras de 3 a 6 foi colocado no tampão de renaturação (100mM de Acetato de Sódio (CH₃COONa) (pH 5.0); 1% (V/V) Triton 100x) visando avaliar a atividade da PnPR-4 em pH ácido. O gel ficou no tampão por duas horas a 37°C, protegido da luz e sob leve agitação. O gel com as amostras 7 e 8 foi colocado em tampão de renaturação (500 mM Tris-HCl (pH 7.8); 1% (V/V) Triton 100x) visando avaliar a atividade da PnPR-4 em pH básico, este gel ficou sob as mesmas condições descritas para o gel das amostras de 3 a 6. O volume de tampão utilizado foi o suficiente para cobrir o gel. Ao termino das duas horas, os géis contento as amostras de 3 a 6, 7 e 8 foram colocados numa solução reveladora (500 mM de Tris-HCl (pH: 8.8); 0.01% (W/V) Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich, USA)) por dez minutos, protegidos da luz e sob leve agitação. Após esse tempo a solução foi descartada e adicionou-se água ultra pura e após uma hora o gel foi visualizado sob a luz UV.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Expressão da Proteína Recombinante PnPR-4

O sistema de expressão heteróloga produziu a proteína recombinante PnPR-4. As células transformadas com a construção pET29a-PnPR4 tiveram a expressão avaliada nos tempos de 0h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h. Dessa avaliação foi demonstrada que a produção da PnPR-4 é ótima no período de 5 horas, onde é observada uma banda diferencial apresentando massa molecular entre 10 e 15 kDa, como pode ser vista na comparação dos extratos protéicos total de células transformadas com a construção e com o vetor sem inserto submetidos a SDS-PAGE (Figura 5).

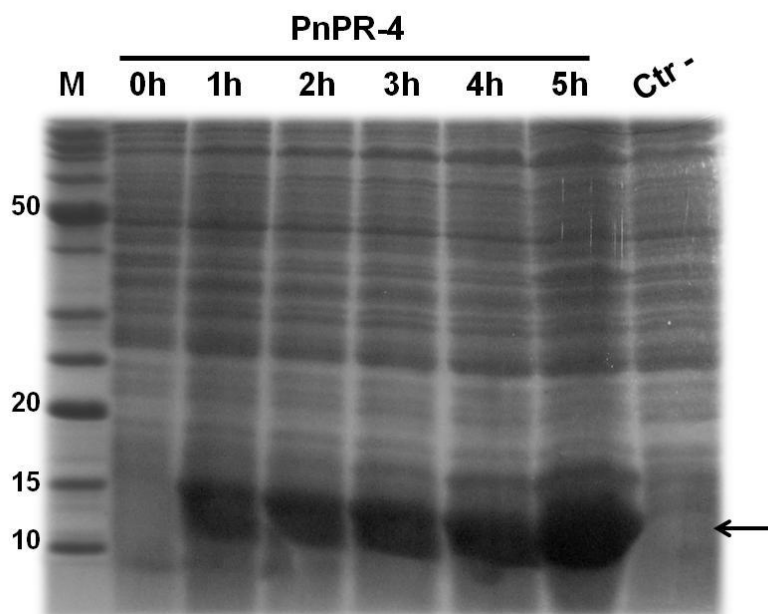


Figura 5. SDS-PAGE dos extratos protéicos total de células (*E. coli* Rosetta (DE3)) transformadas com a construção plasmidial (pET29a+PnPR-4), com expressão induzida nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h, e vetor vazio controle negativo (CTR-). Ambos foram induzidas com IPTG (1mM). M = marcador de massa molecular (kDa). Seta (←): posição referente à proteína recombinante PnPR-4. Observar banda diferencial, quando comparado com o CTR-, no extrato protéico de células com o vetor recombinante, a mais intensa ocorreu em 5 horas de indução.

A expressão heteróloga em sistema bacteriano é, ainda hoje, há mais de 40 anos, a metodologia mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes que

apresentam aplicações em diversas áreas como medicina, indústria farmacêutica e agricultura (Terpe, 2006; Cohen, 2013). Entre os sistemas de expressão heteróloga, os que utilizam cepas da bactéria gram negativa *Escherichia coli* são os mais utilizados, devido a sua rápida multiplicação em meios de fácil manipulação e baixo custo financeiro (Baneyx, 1999; Cohen, 2013) e, principalmente, ter seu genoma completamente descrito e caracterizado (Blattner *et al.*, 1997; Studier *et al.*, 2009).

Apesar das vantagens do uso de bactérias para a produção de proteínas recombinantes, alguns problemas podem ser apontados. Um dos principais é quanto à atividade dessas proteínas, pois em eucariotos, para serem funcionais, essas necessitam de mudanças pós traducionais específicas, não encontradas em procariotos (Parodi *et al.*, 2000; Williams, 2006). Outro problema é a formação de agregados protéicos insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão, formados pela proteína recombinante no citoplasma da célula procariota (Villaverde e Carrió, 2003; García-Fruitós *et al.*, 2012).

No sistema de expressão utilizado, a PnPR-4 formou corpos de inclusão, o que foi observado pela não solubilização da proteína em tampões de lise não desnaturantes, como PBS e Fosfato. A predição da solubilidade da sequência de aminoácidos, pela análise de bioinformática, também mostrou a insolubilidade da PnPR-4 em tampões de lise não desnaturante (Diaz *et al.*, 2009). A proteína recombinante, após a lise e centrifugação não se encontrava na fase aquosa ou sobrenadante, permanecendo no *debris* celular ou fase sólida. Sendo que, a PnPR-4 se solubilizou, apenas em tampões de lise contendo agentes desnaturantes como Uréia e SDS (dados não mostrados).

A formação de agregados protéicos é, talvez, a principal característica das proteínas relacionadas à patogênese do grupo 4 (PR-4), quando produzidas em sistema bacteriano de expressão como é observado para a PR-4 de trigo (*Triticum aestivum*), denominada Wheatwin1 e de *Arabidopsis*, nomeada como AtHEL (Caporale *et al.*, 2004; Bertini *et al.*, 2012).

Proteínas recombinantes que formam corpos de inclusão necessitam de tratamentos diferenciados para se solubilizarem (Shing e Panda, 2005; Schlager *et al.*, 2012), porém, algumas vezes, isso se torna um problema, pois esses tratamentos provocam a desnaturação e, conseqüentemente, a perda de atividade da proteína, que podem ser revertidos utilizando técnicas conhecidas como *refolding*, onde a proteína retorna a sua forma nativa e ativa, como é observado para PR-4 recombinantes

produzidas em sistema heterólogo de expressão (Vallejo e Rinas, 2004; Bravo *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2013).

A eficiência na produção da proteína recombinante demonstra a eficácia do sistema de ligação empregado para a união da ORF ao Vetor, resultando na construção pET29a-PnPR4. Os detalhes da ligação podem ser vistos no esquema da Figura 6. Vetores plasmídiais da família ou série pET (Novagen, 2011) estão entre os mais empregados para produção de proteínas recombinantes, devido apresentarem características como, promotores híbrido, múltiplos sítios de clonagem que possibilitam a incorporação de diferentes seqüências de interesse. A expressão do sistema requer um hospedeiro lisogenizado pela seqüência de DNA “DE3”, que codifica a T7 RNA polimerase do bacteriófago λ DE3, pois a ORF da proteína recombinante é transcrita pela T7 RNA polimerase, onde a expressão está condicionada à presença ou ausência do agente indutor (Tabor e Richardson, 1985; Studier e Moffatt, 1986; Baneyx, 1999).

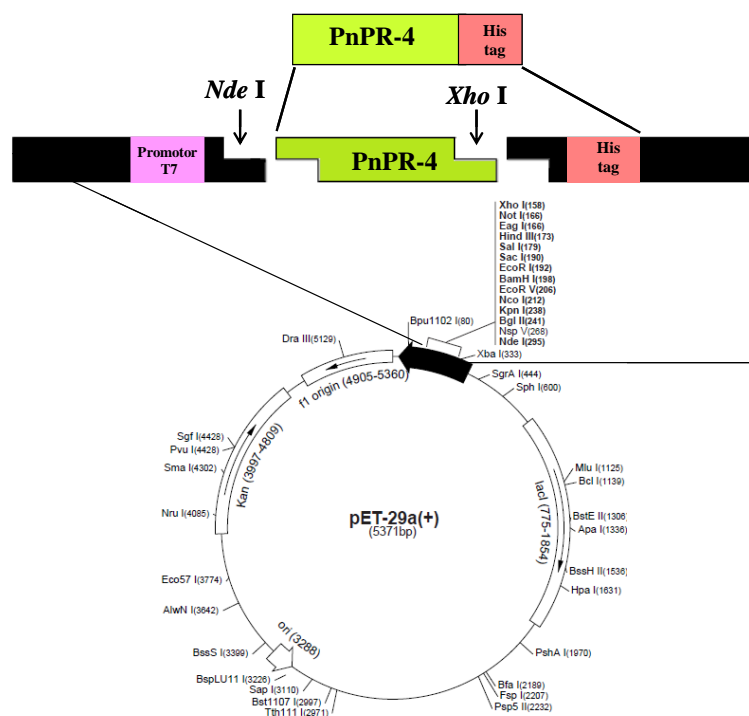


Figura 6. Esquema da construção pET-29a-PnPR-4. Na parte superior estão destacadas a ORF em verde, a cauda de histidina em rosa e os sítios para enzimas *Nde* I e *Xho* I.

No sistema de expressão utilizado para a produção da proteína recombinante PnPR-4, foi utilizada a sequência codificante (ORF) descrita e classificada como pertencente à classe II das PR-4, conforme as análises *in silico* feitas por Tavares (2012). A diferença entre a massa molecular das PR4 se dá pela composição dos domínios protéicos conservados na sua constituição de aminoácidos. Proteínas PR4 podem apresentar massa molecular variando entre ~20kDa, àquelas pertencentes a classe I, e ~15 kDa às pertencentes a classe II (Van loon, 2006). Detalhes do sistema de expressão da PnPR4 podem ser vistos no esquema da Figura 7.

Essa diferença entre classes é dada pela presença ou ausência, na região N-terminal, de um domínio rico em aminoácidos do tipo cisteína, conhecido como domínio de ligação a quitina (Van Parijs *et al.*, 1991; Van loon, 2006) . A característica principal de todas as PR4, quanto a sua constituição de aminoácidos, é a presença do domínio BAWIN na região C-terminal que possui seis cisteínas em regiões conservadas que são responsáveis pela formação de três pontes de sulfeto, sendo atribuída a essas cisteínas a formação dos corpos de inclusão (Wang *et al.*, 2011; Tavares, 2012).

A massa molecular de 13,5 kDa da PnPR-4 é uma característica de PR-4 do tipo II, como observado para a LrPR4 de lírio (*Lycoris radiata*) com 15 kDa, OsPR-4b de arroz (*Oryza sativa*) com 16 kDa e TcPR-4b de cacao (*Theobroma cacao*) de 15 kDa, todas essas pertencem a classe II (Li *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2014).

As proteínas relacionadas à patogênese estão entre a principal classe de moléculas produzidas por plantas em situação de estresse biótico, principalmente causado por fungos fitopatogênicos (Van loon, 2006; Ferreira *et al.*, 2007), como espécies do gênero *Fusarium* que estão entre os principais causadores de fitopatologias (Dean *et al.*, 2012). Dentre essas se destaca a fusariose da pimenteira do reino (*Piper nigrum* L.), causada pelo fungo *F. solani* f. sp. piperis, que impacta negativamente na produção de pimenta do reino, que é um importante produto agrícola em valor de mercado para o Brasil, principalmente no estado do Pará (Tremacoldi, 2010).

Dentre as proteínas relacionadas à patogênese, as pertencentes à família 4 possuem amplo espectro de atividades, são caracterizadas como enzimas do tipo DNase, RNase (Lu *et al.*, 2012; Menezes *et al.*, 2014) e as duas classes da família compõem as sete classes de quitinases produzidas por plantas (Grover, 2012), sendo que enzimas do tipo quitinase estão entre as moléculas mais empregadas em programas de melhoramento genético vegetal contra o ataque de fungos fitopatogênicos (Sarma *et al.*, 2012; Cletus *et al.*, 2013).

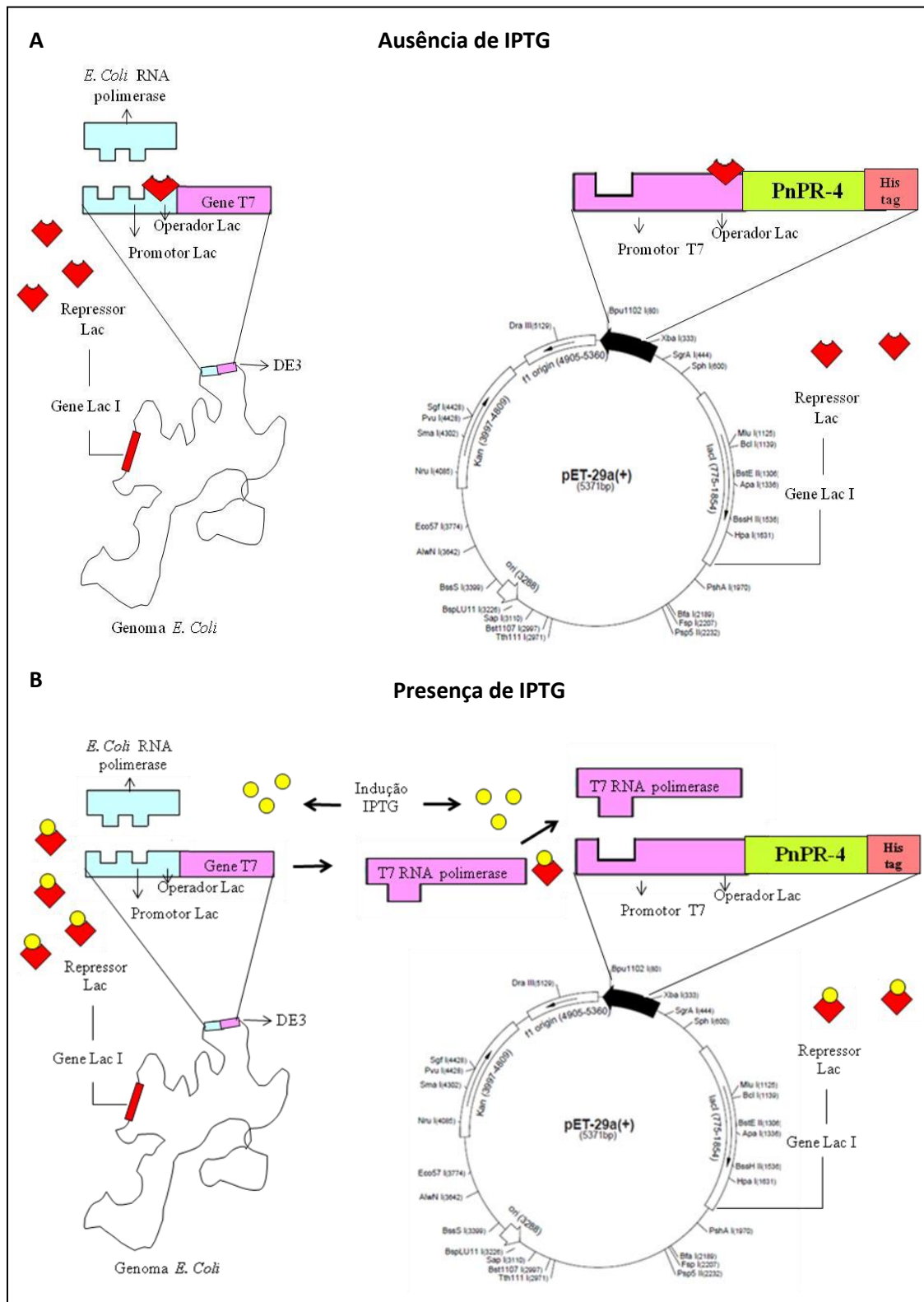


Figura 7. Sistema pET de expressão de proteínas. (A) A expressão do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7 presente no genoma da *E. coli* não é produzido devido a ausência de IPTG no meio e não ocorrendo a transcrição do gene correspondente a PnPR-4. (B) A expressão do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7 é produzida devido a presença do IPTG no meio e uma vez sintetizada a enzima reconhece o promotor T7 presente no plasmídeo pET e transcreve o gene da PnPR-4.

4.2 Avaliação da Atividade da PnPR-4.

Visando avaliar a estabilidade da PnPR-4, sua atividade quitinolítica foi realizada em meio ácido (pH: 5.0) e Básico (pH: 7.8) conforme metodologia de detecção da atividade de quitinase em gel de poliacrilamida após eletroforese, descrita por Trudel e Asselin (1989), que é baseada na clivagem da glicol quitina, que atuou como substrato da enzima e foi obtida a partir do processo de acetilação da glicol quitosana (Figura 8).

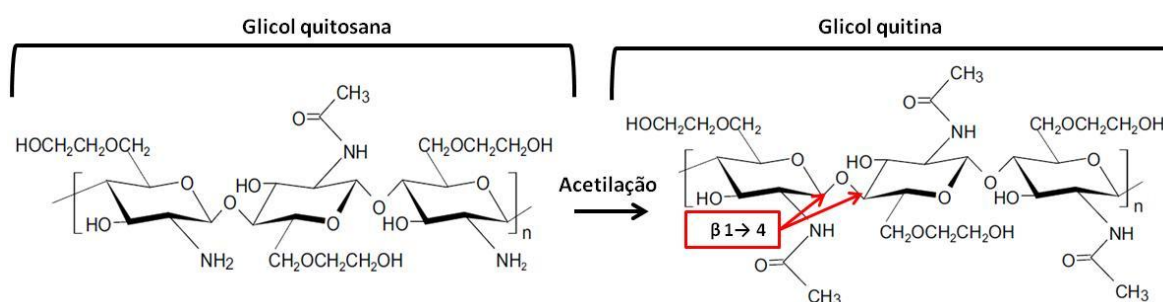


Figura 8. Acetilação da glicol quitosana. Observar do lado esquerdo e direito as fórmulas estruturais da glicol quitosana e glicol quitina, respectivamente. Destaque para a ligação $\beta 1 \rightarrow 4$ da glicol quitina, que é o sítio de clivagem de quitinases que usam este polímero como substrato.

A detecção da atividade de quitinase no gel de poliacrilamida se deve a afinidade da Glicol quitina pelo corante Calcofluor White que é fluorescente sob a luz UV (Harrington e Hageage, 2003). No gel, onde há atividade, a banda referente à quitinase aparece como uma zona lítica, não fluorescente, segundo Trudel e Asselin (1989), pois, como nesse local houve a clivagem do substrato, não é possível a ligação do corante a este, logo sob a luz UV não ocorre fluorescência.

Para a detecção da atividade de quitinase da PnPR-4, foram utilizados 8 tratamentos, 4 correspondentes a amostras do extrato protéico total sem a PnPR-4 e, os outros 4, correspondentes a proteína recombinante. Em meio ácido, pH: 5.0, a proteína recombinante PnPR-4 apresentou atividade (Figura 9). Todas as amostras usadas no ensaio de quitinase foram tratadas com o mesmo tampão de amostra, sendo que, em duas dessas foi adicionado ao tampão o agente desnaturante β -mercaptoetanol e em seguida elas foram submetidas à fervura por cinco minutos, para análise da atividade em

condições desnaturantes. A atividade pode ser observada pela formação de zonas líticas no gel. Onde, é possível notar a clivagem do substrato pela PnPR-4, mesmo na amostra passada por tratamento desnaturante.

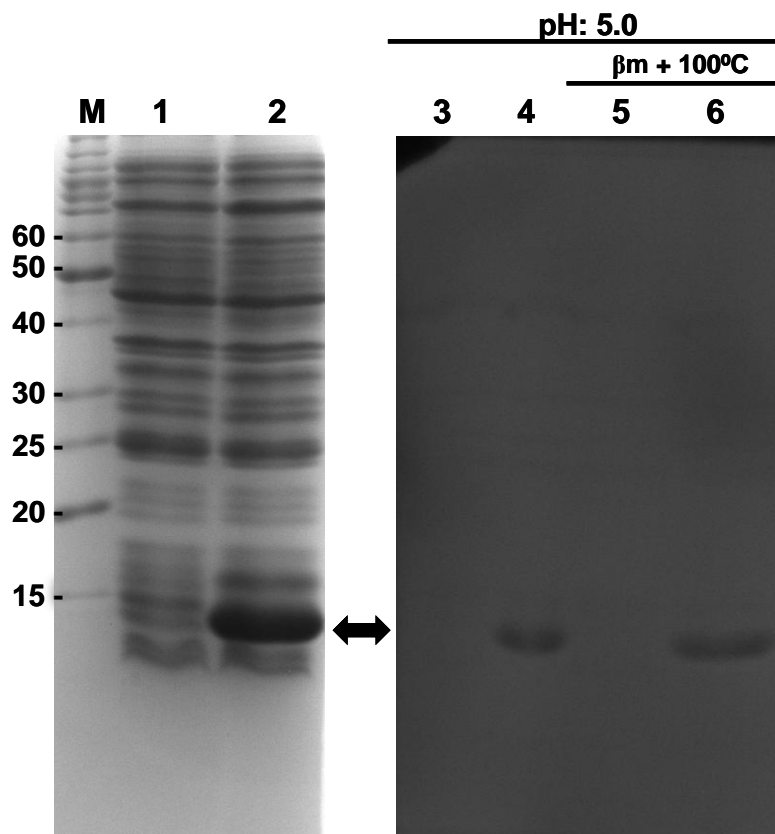


Figura 9. Atividade de quitinase da PnPR-4 em meio ácido (pH: 5.0) após SDS-PAGE. As colunas 1 e 2 são, respectivamente, amostras de extratos protéicos total sem (1) e com a PnPR-4 (2). O gel com os tratamentos 1 e 2 foi corado com azul de comassie e visualizado sob luz branca. M: Marcador de massa molecular em kDa. As colunas 3, 4, 5, 6 são tratamento dos extratos protéicos total sem (3 e 5) e com PnPR-4 (4 e 6). O gel com os tratamentos 3, 4, 5, 6 foi corado com Calcofluor White e visualizado sob luz UV. Notar as zonas líticas na mesma posição em que se encontra a PnPR-4 da coluna 2 e a atividade da PnPR-4 mesmo em condições desnaturantes. β m: β -mercaptoetanol, 100°C: fervura. Todas as colunas ímpares representam o controle negativo.

A degradação do substrato pela PnPR-4 ocorreu, mesmo a proteína tendo passado por tratamento com agente desnaturante, β -mercaptoetanol, e elevada temperatura. Essa é uma característica fundamental das quitinases de plantas, apresentarem atividade mesmo em condições adversas (Trudel e Asselin, 1989; Trudel *et al.*, 1989; Patel *et al.*, 2010). A atividade, ocorrida mesmo sob condições desnaturantes, mostrou a alta estabilidade da PnPR-4 pois, nas condições avaliadas, o β -mercaptoetanol, que é um agente desnaturante responsável pelo rompimento das

pontes de sulfeto que se formam entre as Cisteínas, presentes na sequência de aminoácidos, não foi capaz de romper as pontes de sulfeto formadas pela PnPR-4.

Em meio básico, também houve atividade quitinolítica (Figura 10). A amostra correspondente ao extrato protéico total com proteína recombinante PnPR-4, apresentou atividade em meio básico (pH: 7.8) que pode ser vista pela zona lítica no gel corado com Calcofluor White.

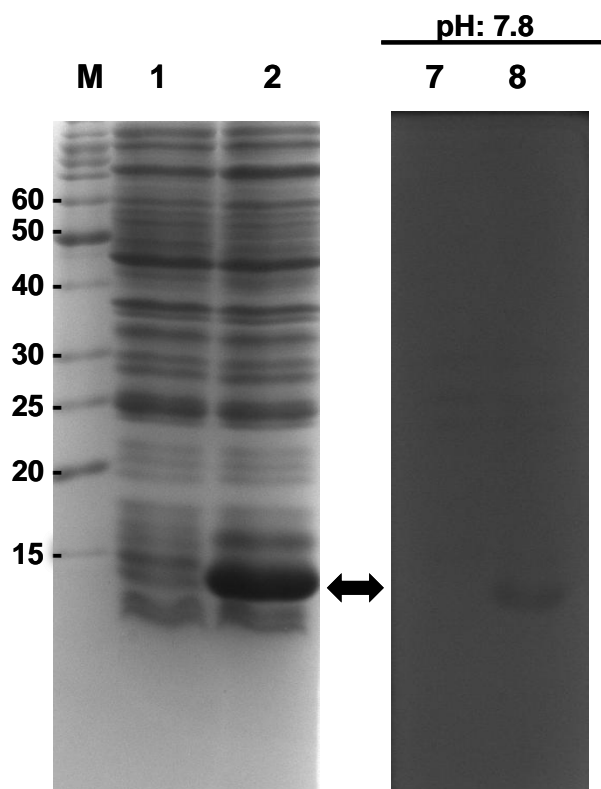


Figura 10. Atividade de quitinase da PnPR-4 em meio Básico (pH: 7.8) após SDS-PAGE. As colunas 1 e 2 são, respectivamente, tratamentos dos extratos protéicos total sem (1) e com a PnPR-4 (2). O gel com as amostra 1 e 2 foi corado com azul de comassie e visualizado sob luz branca. As colunas 7 e 8 são tratamentos dos extratos protéicos total sem (7) e com (8) a PnPR-4. O gel com essas amostras foi corado com Calcofluor White e visualizado na luz UV, a zona lítica é observada na amostra 8 no mesmo local da PnPR-4 da amostra 2 no gel corado com azul de comassie.

A atividade nessa ampla faixa de pH é uma característica muito importante, pois plantas sob ataque de fungos fitopatogênicos, sofrem alterações em sua fisiologia, dessa forma a atividade quitinolítica contra fungos pode continuar ativa. Nos dois meios, ácido e básico, a PnPR-4 apresentou atividade. Essa é uma característica das quitinases de plantas, possuem atividade em uma ampla faixa de pH, desde extremamente ácidos a extremamente básicos, no entanto sua atividade quitinolítica máxima é na faixa de pH entre 3.0-5.0 (Taira, *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007; Sørensen *et al.*, 2010; Liu *et al.*,

2010; Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Nos meios avaliados, a atividade da PnPR-4 foi mais eficaz em meio ácido, como pode ser observado quando se compara as zonas líticas formadas, que em pH: 5.0 foi mais intensa que em pH:7.8 (Figura 11).

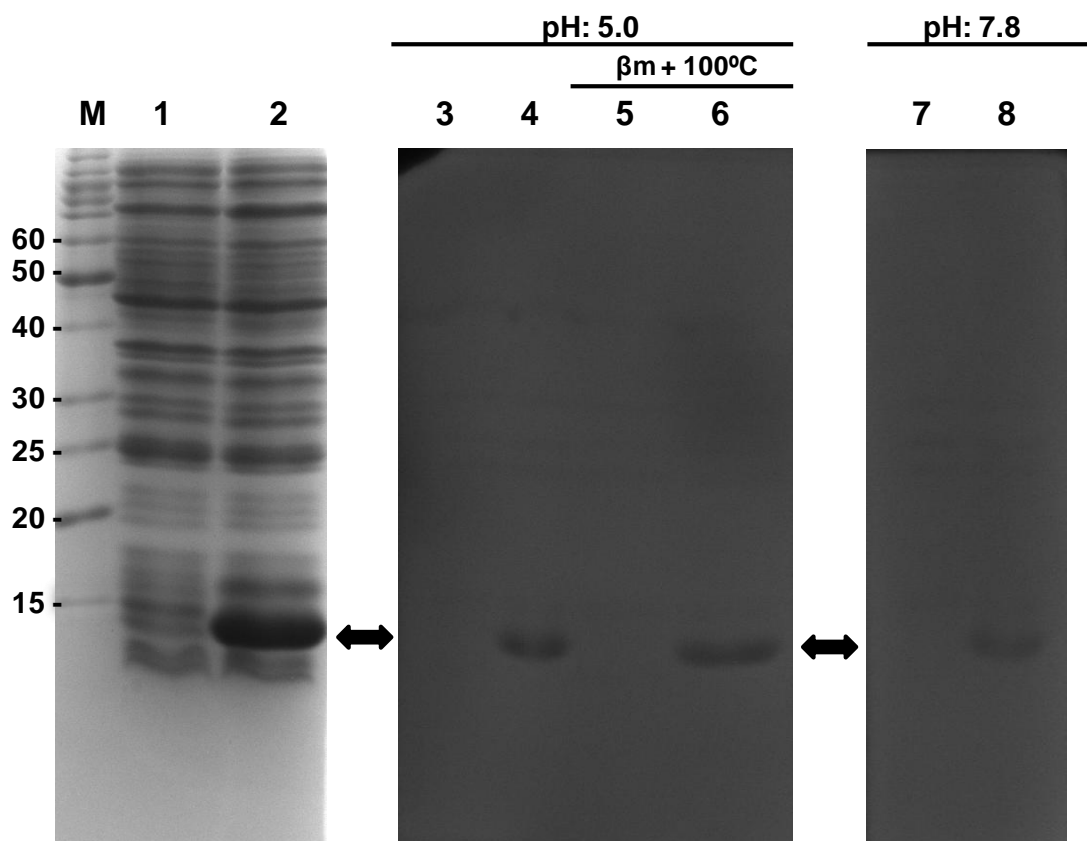


Figura 11. Visão geral da atividade de quitinase em meio ácido e básico. Notar a atividade da PnPR-4, tanto no meio ácido (pH: 5.0) quanto no meio básico (pH: 7.8), pelas zonas líticas formadas PnPR-4. Observar também a zona lítica mais intensa de PnPR-4 no meio ácido. Todas as colunas ímpares são de controle negativo, e todas as colunas pares são de extratos com a PnPR-4. M: Marcador de massa molecular em kDa.

As quitinases são reconhecidas como enzimas que clivam quitina, no entanto essa atividade preconizada para todas as quitinases nem sempre ocorre. Em plantas, essas enzimas possuem diversas funções, estando envolvidas inclusive em resposta ao estresse abiótico (Grover, 2012), apesar das diversas funções atribuídas as quitinases de plantas, a atividade de maior interesse ainda é a quitinolítica, dada à quitinases que degradam quitina (Dahiya *et al.*, 2006; Adrangi e Faramarzi, 2013), como encontrado na PnPR-4. Dentre as PR-4 descritas pouco ainda se conhece sobre a atividade quitinolítica deste grupo. A Tabela 2 mostra algumas PR-4 e suas características.

Tabela 2. PR-4 da classe II de diferentes espécies vegetais comparada com a PnPR-4

Nome	Espécie	Estrutura	Atividade				Referência
			Quitinase	RNase	DNase	Antifúngica	
PnPR-4	<i>Piper nigrum</i>	Domínio Barwin	Sim	nd	nd	nd	Presente trabalho
TcPR-4b	<i>Theobroma cacao</i>	SP-Domínio Barwin	Não	sim	sim	sim	Menezes <i>et al.</i> (2014)
CcPR-4	<i>Capsicum chinense</i>	SP-Domínio Barwin	Não	sim	sim	nd	Guevara-Morato <i>et al.</i> (2010)
LrPR4	<i>Lycoris radiate</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	sim	não	sim	Li <i>et al.</i> (2010)
OsPR-4b	<i>Oryza sativa</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	nd	nd	sim	Zhu <i>et al.</i> (2006)
MdPR-4	<i>Malus domestica</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	sim	nd	sim	Bai <i>et al.</i> (2013)
Wheatwin1	<i>Triticum aestivum</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	Sim - inibição por 5'ADP	nd	sim	Caporale, (2004)
Wheatwin2	<i>Triticum aestivum</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	nd	nd	sim	Caporale, (2004) e Caruso <i>et al.</i> (1996)
FaPR4 modificada*	<i>Ficus awkeotsang</i>	SP-Domínio Barwin -VS	Sim	Sim - Tipo A Inibida com 5'ADP	não	sim	Lu <i>et al.</i> (2012)
AtHEL modificada*	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Domínio Barwin	Não	sim	não	sim	Bertini <i>et al.</i> (2012)
NtPR-4B	<i>Nicotiana tabacum</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	nd	nd	nd	Friedrich <i>et al.</i> (1991)
CaPR-4 1	<i>Capsicum annuum</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	nd	nd	nd	Shin <i>et al.</i> (2001)
SIPR-4	<i>Solanum lycopersicum</i>	SP-Domínio Barwin	Nd	nd	nd	nd	Linthorst <i>et al.</i> (1991)
Barwin	<i>Hordeum vulgare</i>	Domínio Barwin	Nd	nd	nd	nd	Svensson <i>et al.</i> (1992)

nd: não determinada; SP: Peptídeo sinal; VS: sinal vacuolar. * Proteína modificada por engenharia genética.

Lu *et al.* (2012) identificaram a atividade quitinolítica da PR-4 de *Ficus awkeotsang* (Figo), nomeada como FaPR4, essa identificação foi importante para que as PR-4 continuem sendo consideradas quitinases, pois Caruso *et al.* (2004) propuseram a retirada das PR-4 da família das quitinases, devido o domínio de ligação a quitina estar presente em outras famílias Protéicas.

A metodologia descrita para a atividade da PnPR-4 foi utilizada por Guevar-Morato *et al.*, 2010 que não encontraram atividade quitinolítica da PR-4 de *Capsicum chinense*, nomeada CcPR-4. O mesmo ocorrendo com a PR-4 de *Arabidopsis thaliana* nomeada de AtHEL descrita por Bertini *et al.*, 2012, utilizando a mesma metodologia da PnPR-4, também não encontraram atividade quitinolítica e propuseram o mesmo que Caruso *et al.* (2004), a retirada das PR-4 do grupo das quitinases.

A produção da proteína recombinante PnPR-4, advêm dos estudos realizados por de Souza *et al.* (2011) que lançaram as bases para compreensão, em nível molecular, da interação planta-patógeno ocorrida entre o *F. solan* f. sp. Piperis e a *Piper nigrum* L. Dada a importância dessa cultura para o estado do Pará, a produção da PnPR-4, suas características e identificação de sua atividade representam avanços no combate a fusariose, doença que causa inúmeros prejuízos nos pimentais paraense.

5. Conclusão

- O sistema de expressão utilizado é eficaz para a produção da PnPR-4.
- A PnPR-4 é uma quitinase e apresenta atividade quitinolítica,
- A PnPR-4 é altamente estável. Pois apresenta atividade *in vitro* mesmo em condições adversas.

6. REFERÊNCIAS

Aam, B. B.; Heggset, E. B.; Norberg, A. L.; Sørli, M., Vårum K. M.; Eijsink, V. G. H. (2010). Production of Chitoooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs*. 8, 1482-1517.

Aderem, A.; Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like Receptors in the Induction of the Innate Immune Response. *Nature*. 406, 782-787.

Adrangi, S.; Faramarzi, M. A.; Shahverdi, A. R.; Sepehrizadeh, Z. (2010). Purification and Characterization of Two Extracellular Endochitinases from *Massilia timonae*. *Carbohydrate Research*, 345 402–407.

Ahuja, I.; de Vos, R. C.H.; Bonés, A. M.; Hall, R. D. (2010). Plant Molecular Stress Responses Face Climate Changed. *Trends in Plant Science*. 12, 664-674.

Anand, A.; Lei, Z.; Sumner, L. W.; Mysore, K. S.; Yasuyuki Arakane, Y.; Bockus, W. W.; Muthukrishnan, S. (2004). Apoplastic Extracts from a Transgenic Wheat Line Exhibiting Lesion-Mimic Phenotype Have Multiple Pathogenesis-Related Proteins That Are Antifungal. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 1306–1317..

Arie, M.; Hikichia, K.; Takahashib, K.; Esakaa, M. (2000). Characterization of a Basic Chitinase Which is Secreted by Cultured Pumpkin Cells. *Physiologia Plantarum*. 110, 232–239.

Ausubel, F. M. (2005). Are Innate Immune Signaling Pathways in Plants and Animals Conserved? *Nature Immunology*. 6, 973-979.

Bai, S.; Dong, C.; Li, B.; Hongyi Dai, H. (2013) A PR-4 Gene Identified From *Malus domestica* is Involved in the Defense Responses Against *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 62, 23-32.

Bai, J.; Pennill, L. A.; Ning, J.; Lee, S. W.; Ramalingam, J.; Webb, C. A.; Zhao, B.; Sun, Q.; Nelson, J. C.; Leach, J. E.; Hulbert, S. H. (2002). Diversity in Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat Genes in Cereals. *Genome Research*. 12. 1871-1884.

Baneyx, F. (1999). Recombinante protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 411-421.

Bertini, L.; Caporale, C.; Testa, M.; Proietti, P.; Caruso, C. (2009). Structural Basis of the Antifungal Activity of Wheat PR4 Proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 583 , 2865–2871.

- Bertini, L.; Proietti, S.; Aleandri, M. P.; Mondello, F.; Sandini, S.; Caporale, C.; Caruso, C. (2012). Modular structure of HEL protein from *Arabidopsis* reveals new potential functions for PR-4 proteins. *Biological Chemistry*, 393 (12), 1533-1546.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *SCIENCE*, 277, 1453-1462.
- Boller, T.; He, S. Y. (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324, 742-743.
- Boller, T.; Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.
- Bravo, J. M.; Campo, S.; Murillo, I.; Coca, M.; Segundo, B. S. (2003). Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant Molecular Biology*, 52, 745-759.
- Brown, D. W.; Robert A. E. Butchko, R. A. E.; Proctor, R. H. (2006). *Fusarium* Genomic Resources: Tools to Limit Crop Diseases and Mycotoxin Contamination. *Mycopathologia*, 162, 191-199.
- Brown, T. A. Gene Cloning & DNA Analysis an introduction, 6^a edição, Editora Wiley Blackwell, 2010, 338p.
- Buchel, A. S.; Linthorst, H. J.M. (1999). PR-1: A Group of Plant Proteins Induced Upon Pathogen Infection. In *Pathogenesis related proteins in plants*. S. K. Datta and S. Muthukrishnan, Ed.: 295p. CRC Press LLC, EUA.
- Caporale, C.; Di Berardino, I.; Leonardi, L.; Bertini, L.; Cascone, A.; Buonocore, V.; Caruso, C. (2004). Wheat Pathogenesis-Related Proteins of Class 4 Have Ribonuclease Activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 575, 71-76.
- Caruso, C.; Caporale, C.; Chilosi, G.; Vacca, F.; Bertini, L.; Magro, P.; Poerio, E.; Buonocore, V. (1996). Structural and Antifungal Properties of a Pathogenesis-Related Protein from Wheat Kernel. *Journal of Protein Chemistry*, 15 (1), 35-44.
- Caruso, C.; Bertini, L.; Tucci, M.; Caporale, C.; Nobile, M.; Leonardi, L.; Buonocore, V. (2001). Recombinant wheat antifungal PR4 proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 23, p. 380-388.

- Catanzariti, A.; Dodds, P. N.; Lawrence, G. J.; Ayliffe, M. A.; Ellisa, J. G. (2006). Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *The Plant Cell*, 18, 243–256.
- Chang, J. F.; Urbach, J. M.; Law, T. F.; Arnold, L. W.; Hu, A.; Gombar, S.; Grant, S. R.; Ausubel, F. M.; Dangl, J. L. (2005). A High-Throughput, Near-Saturating Screen for Type III Effector Genes From *Pseudomonas syringae*. *Proceedings National Academy of Sciences of the USA*, 102, 2549–2554.
- Chen, Y. T.; Hsu, L. H.; Huang, P.; Tsai, T. C.; Lee, G. C.; Shaw, J. F. (2007). Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 714–722.
- Chisholm, S. T.; Coaker, G.; Brad Day, B.; Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124, 803–814.
- Cletus, J.; Balasubramanian, V.; Vashisht, D.; Sakthivel, N (2013). Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease Resistance. *Biotechnol Lett*, 35, 1719–1732.
- Cohen, S. N. (2013). DNA cloning: A personal view after 40 years. *PNAS*, 110 (39) 15521–15529.
- Dahiya, N.; Tewari, R.; Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 773–782.
- Dangl, J. L.; Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 862–833.
- Dangl, J. L.; Horvath, D. M.; Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science*, 341, 746–751.
- Davis, E. L.; Hussey, R. S.; Mitchum, M. G.; Baum, T. J. (2008). Parasitism Proteins in Nematode–Plant Interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 360–366.
- Dean, R.; Van Kan, J. A. L.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Di Pietro, A.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414–430.
- Des Marais, D. L.; Juenger, T. E. (2010). Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance. *Annals of the New York academy of sciences*. 1206, 56–79.

Desjardins, A. E.; Proctor, R. H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 47–50.

de Souza, C. R. B.; Santa-Brígida, A. B.; Santos, R. C.; Costa, C. N. M.; Darnets, H.; Harada, M. L. (2011) Identification of sequences expressed during compatible blackpepper-*Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2553–2560

De Vos, M.; Oosten, V. R. V.; Remco, M. P. Van Poecke, R. M. P. V.; Pelt, J. A. V.; Pozo, M. J.; Mueller, M. J.; Buchala, A. J.; Métraux, J. P.; Van Loon, L. C.; Dicke, M.; Pieterse, M. J. (2005). Signal Signature and Transcriptome Changes of Arabidopsis During Pathogen and Insect Attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (9), 23-937.

Diaz, A.; Tomba, E.; Lennarson, R.; Richard, R.; Bagajewicz, M.; Harrison, R.G. (2009) Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 374-383.

D'Ippólito, S.; Martín, M. L.; Salcedo, M. F.; Atencio, H. M.; Casalongué, C. A.; Godoy, A. V.; Fiol, D. F. (2010). Transcriptome profiling of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* -infected potato tubers provides evidence of an inducible defense response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75, 3-12.

Dodds, P. N.; Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539-548.

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 In: Poltronieri, L.S.; Trindade, D.R. (Ed.). *Manejo integrado das principais doenças de cultivos amazônicos*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p1-16, 2002.

Edreva, A. (2005). pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*, 31, 105-124.

Ferreira, R. B.; Monteiro, S.; Freitas, R.; Santos, C. N.; Chen, Z.; Batista, L. M.; Duarte, J.; Borges, A.; Teixeira, A. R. (2007). The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 8 , 677–700.

Flor, H. H. (1971). Current Status of the gene-for-gene concept. *Annual Reviews Phytopathol*, 9, 275-296.

Foley, J. A.; DeFries, R.; Asner, G. P.; Barford, C.; Bonan, G.; Carpenter, S. R.; Chapin, F. S.; Coe, M. T.; Daily, G. C.; Gibbs, H. K.; Helkowski, J. H.; Holloway, T.; Howard, E. A.; Kucharik, C. J.; Monfreda, C.; Patz, J. A.; Prentice, C.; Ramankutty, N.; Snyder, P. K. (2005). Global Consequences of Land Use. *Science*, 309, 570-574.

Foley, J. A.; Ramankutty, N.; Brauman, K. A.; Cassidy, E. S.; Gerber, J. S.; Johnston, M.; Mueller, N. D.; Connell, C. O.; Ray, D. K.; West, P. C.; Balzer, C.; Bennett, E. M.; Carpenter, S. R.; Hill, J.; Monfreda, C.; Stephen Polasky, S.; Rockstrom, J.; Sheehan, J.; Siebert, S.; Tilman, D.; Zak, D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478, 337-342.

Friedrich, L.; Moyer, M.; Ward, E.; Ryals, J. (1991). Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxy-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2. *Molecular and General Genetics*, 230, 113–119.

García-Fruitós, E.; Vázquez, E.; Díez-Gil, C.; Corchero, J. L.; Seras-Franzoso, J.; Ratera, I.; Jaume Veciana, J.; Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. *Trends in Biotechnology*, 30(2), 65-70.

Godfray, H. C. J.; Beddington, J. R.; Ian R. Crute, I. R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J. F.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S. M.; Camilla, T. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327, 812-817.

Gomez, L.; Allona, I.; Casado, R.; Aragoncillo, C. (2002). Seed chitinases. *Seed Science Research*, 12, 217–230.

Gómez-Gómez, L.; Boller, T. (2000). FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5, 1003–1011.

Gorjanović, S. (2009). A Review: Biological and Technological Functions of Barley Seed Pathogenesis- Related Proteins (PRs). *Journal of the Institute of Brewing*. 115(4), 334–360.

Gottwald, T. R. (2010). Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 119–39.

Grant, S. R.; Fisher, E. J.; Chang, J. H.; Mole, B. M.; Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and Manipulation: Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60, 425–49.

Grover, A. (2012). Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 57–73.

Guevara-Morato, M.A.; de Lacoba, M.G.; García-Luque, I.; Serra, M.T. (2010). Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities, *J. Exp. Bot.*, 61, 3259-3271.

Hammond-Kosack, K. E.; Jones, J. D.G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Review Plant Physiology*. 48, 575–607.

Harrington, B. J.; Hageage, G.J. (2003). Calcofluor White: A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. *Laboratory medicine*, 5 (34), 361-367.

Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A. (2000). Plant cellular and molecular responses to high Salinity. *Annual Review Plant Physiology*. 51, 463–99.

Hashiguchi, A.; Ahsan, N.; Komatsu, S. (2010). Proteomics application of crops in the context of climatic changes. *Food Research International*, 43, 1803–1813.

Hejgaard, J.; Jacobsen, S.; Bjrarn, S. E.; Kragh, M. K. (1992). Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf. *Federation of European Biochemical Societies*, 3, 389-392.

Herrera-Estrella, A.; ChetZ, I. (1999). Chitinases in biological control. In: P. Jollea, R.A.A. Muuarelli (eds). *Chitin and Chitinases*, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp 171-184.

Hogenhout, S. A.; Van der Hoorn, R. A. L.; Terauchi, R.; Sophien Kamoun, S. (2009). Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22 (2), 115–122.

Hou, M.; Xu, W.; Hui Bai, H.; Liu, Y.; Li, L.; Liu, L.; Liu, B.; Liu, G. (2012). Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Plant Cell Report*, 31, 895–904.

Hrmova, M.; De Gori, R.; Smith, B. J.; Jon K. Fairweather, J. K.; Driguez, H.; Varghese, J. N.; Geoffrey B. Fincher, G. B. (2002). Structural Basis for Broad Substrate Specificity in Higher Plant β -D-Glucan Glucohydrolases. *The Plant Cell*, 14, 1033–1052.

Huang, X.; Wang, J.; Du, Z.; Zhang, C.; Li, L.; Xu, z. (2013). Enhanced resistance to stripe rust disease in transgenic wheat expressing the rice chitinase gene RC24. *Transgenic Research*, 22, 939–947.

IBGE (2015). Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro v.29 n.2 p.1-112. Disponível em ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201502.pdf. Acessado em 30 março 2015.

Iriti, M.; Faoro, F. (2007). Review of innate and specific immunity in plants and

Animals. *Mycopathologia*, 164, 57–64.

Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329.

Jayaraj, J.; Punja, Z. K. (2007). Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Report*, 26, 1539–1546.

Jung, H. W.; Kim, W.; Hwang, B. K. (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant, Cell and Environment*, 26, 915–928.

Khush, R. S.; Lemaitre, B. (2000). What the Drosophila genome says about animal immunity. *TIG*, 6, 442–449.

Kliebenstein, D. J. (2012). Plant Defense Compounds: Systems Approaches to Metabolic Analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 155–173.

Kovács, G.; Sági, L.; Jacon, G.; Arinaitwe, G.; Busogoro, J.; Thiry, E.; Strosse, H.; Swennen, R.; Remy, S. (2013). Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. *Transgenic Research*, 22, 117–130.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Leubner-Metzger, G.; Meins, F. Jr. (1999). Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds) Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press LLC, Boca Raton, pp 49–76.

Leubner-Metzger, G. (2002). Seed after-ripening and over-expression of class I β -1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta*, 215, 959–968.

Li, X.; Xia, B.; Jiang, Y.; Wu, Q.; Wang, C.; He, L.; Wang, R. (2010). A new pathogenesis-related protein, LrPR4, from *Lycoris radiata*, and its antifungal activity against *Magnaporthe grisea*. *Molecular Biology Reports*. v. 37, p. 995–1001.

Liu, J.; Ekramoddoullah, A. K. M. (2006). The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68, 3–13.

Liu, Z. H.; Yang, C. P.; Qi, X. T.; Xiu, L. L.; Wang, Y. C. (2010). Cloning, heterologous expression, and functional characterization of a chitinase gene, Lbchi32, from *Limonium bicolor*. *Biochemical Genetics*, 48, 669–679.

- Liu, Z. W.; Li, H. P.; Cheng, W.; Yang, P.; Zhang, J. B.; Gong, A. D.; Feng, Y. N.; Fernando, W. G.D.; Liao, Y. C. (2012). Enhanced overall resistance to *Fusarium* seedling blight and *Fusarium* head blight in transgenic wheat by co-expression of anti-fungal peptides. *Eur J Plant Pathol*, 134, 721–732.
- Liu, W.; Liu, J.; Ning, Y.; Bo Ding, B.; Wang, X.; Wang, Z.; Guo-Liang Wang., G. L. (2013). Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant*, 6 (3), 605–620.
- Lobell, D. B.; Gourdjji, S. M. (2012). The Influence of Climate Change on Global Crop Productivity. *Plant Physiology*, 160, 1686–1697.
- Lu, H.; Lin, J.; Chua, A. C. N.; Chung, T.; Tsai, I.; Tzen, J. T. C.; Chou, W.(2012). Cloning and expression of pathogenesis-related protein 4 from jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes associated with ribonuclease, chitinase and anti-fungal activities. *Plant Physiology and Biochemistry*, 56, 1-13.
- Ma, L.; Geiser, D. M.; Proctor, R. H.; Rooney, A. P.; O'Donnell, K.; Trail, F.; Gardiner, D. M.; Manners, J. M.; Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399–416.
- Maekawa, T.; Kufer, T. A.; Schulze-Lefert, P. (2011). NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *NATURE IMMUNOLOGY*, 12, 818-826.
- McGuinness, D. H.; Dehal, P. K.; Pleass, R. J. (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *TRENDS in Parasitology*, 19, 312-319.
- Medzhitov, R.; Janeway, C. A. Jr. (2002). Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science*, 296, 298-300.
- Medzhitov, R.; Janeway, C. A. Jr. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*, 91, 295–298.
- Menezes, S. P.; Mario, E.; Silva, A.; Lima, E. M.; Sousa, A. O.; Andrade, B. S.; Lemos, L. S. L.; Gramacho, K. P.; Gesteira, A. S.; Pirovani, C. P.; Micheli, F. (2014). The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca²⁺ and Mg²⁺ dependent-DNase activity and antifungal action on *Moniliophthora perniciosa*. *BMC Plant Biology*, Doi: 1471-2229/14/161
- Mengiste, T. (2012). Plant Immunity to Necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 267–294.

- Murad, A. M.; Pelegrini, P. B.; Neto, S. M.; Franco, O. L. (2007). Novel Findings of Defensins and their Utilization in Construction of Transgenic Plants. *Transgenic Plant Journal*, 1, 39-48.
- Mukhtar, M. S. (2013). Engineering NLR immune receptors for broad-spectrum disease resistance. *Trends in Plant Science*, 18(9), 496 - 472.
- Neale, A. D. ; Wahleithner, J. A. ; Lund, M. ; Bonnett, H. T.; Kelly, A. ; Meeks Wagner, D. R. ; Peacock, W. J. ; Dennisa, E. S..(1990). Chitinase, β -1,3-Glucanase, Osmotin, and Extensin Are Expressed in Tobacco Explants during Flower Formation. *The Plant Cell*, 2, 673-684
- Neuhaus, J. (1999). Plant Chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta S.K., Muthukrishnan S. (eds) Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press LLC, Boca Raton, pp -76.
- Nelson, D. L.; Cox. M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5ª Edição, Artmed, 2010, São-Paulo, 1273 p.
- Newman, M.; Sundelin, T.; Nielsen, J. T.; Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-14.
- NOVAGEM, **Pet System Manual**, TB055 11th Edition, 2006, 80p.
- Nürnbergger, T.; Brunner, F.; Kemmerling, B.; Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198, 249–266.
- Padovan, L.; Scocchi, M.; Tossi, A. (2010). Structural Aspects of Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 2010 (11), 210-219.
- Parodi, A. J. (2000). Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annual Review of Biochemistry*. (69), 69-93.
- Patel, A. K.; Singh, V. K.; Yadav, R. P.; Moir, A. J. G.; Jagannadham, M. V.(2010). Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Process Biochemistry*, 45, 675–681.
- Ponstein, A. S.; Bres-Vloemans, S. A.; Sela-Buurlage, M. B.; van den Elzen, P. J. M. Melchers, L. S.; Cornelissen, B. J. C. (1992). A Novel Pathogen- and Wound-Inducible Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Protein with Antifungal Activity. *Plant Physiology*, 104, 109-118.
- Robatzek, S.; Bittel, P.; Chinchilla, D.; Köchner, P.; Felix, G.; Shiu, S.; Boller, T. (2007). Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor

LeFLS2, an orthologue of *Arabidopsis* FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Molecular Biology*, 64, 539–547.

Ryang, S.; Chung, S.; Lee, S.; Cha, J.; Hak Yong Kim, H. Y.; Cho, T. (2002) Isolation of Pathogen-Induced Chinese Cabbage Genes by Subtractive Hybridization Employing Selective Adaptor Ligation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299, 352–359.

Sarma, K.; Dehury, B.; Sahu, J.; Sarmah, R.; Sahoo, S.; Sahu, M.; Sem, P.; Modi, M. K.; Barooah, M. (2012). A Comparative Proteomic Approach to Analyse Structure, Function and Evolution of Rice Chitinases: A Step Towards Increasing Plant Fungal Resistance. *Jornal Molecular Model*, 18, 4761–4780.

Schlager, B.; Straessle, A.; Hafen, E. (2012). Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. *BMC Biotechnology*. doi:10.1186/1472-6750-12-95

Schwessinger, B.; Ronald, P. C.(2012). Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 451–82.

Sels, J.; Mathys, J.; De Coninck, B. M. A.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M.F.C. (2008). Plant Pathogenesis-Related (PR) Proteins: A Focus on PR Peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 941–950.

Shah, J. M.; Singh, R.; Veluthambi, K. (2013) Transgenic rice lines constitutively co expressing tlp-D34 and chi11 display enhancement of sheath blight resistance. *Biologia Plantarum*, 57 (2), 351-358.

Shin, R.; Lee, G.; Chang-Jin Park, C.; Kim, T.; Jin-Sam You, J.; Nam, Y.; Paek, K. (2001). Isolation of Pepper mRNAs Differentially Expressed During the Hypersensitive Response to Tobacco Mosaic Virus and Characterization of a Proteinase Inhibitor Gene. *Plant Science*, 161, 727–737.

Shin, S.; Mackintosh, C. A.; Lewis, J.; Heinen, S. J.; Radmer, L.; Dill-Macky, R.; Baldridge, G. D.; Zeyen, R. J.; Muehlbauer, G. J.(2008). Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany*, 59 (9), 2371–2378.

Singh, M. S.; Panda, A. K. (2005) Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Bodys Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (4), 303-310

Shinshi, H.; Neuhaus, J.; Ryals, J.; Meins, F. Jr. (1990). Structure of a Tobacco Endochitinase Gene: Evidence that Different Chitinase Genes Can Arise by Transposition of Sequences Encoding a Cysteine-Rich Domain. *Plant Molecular Biology*, 14, 357-368.

Sørensen, H. P.; Madsen, L. S.; Petersen, J.; Andersen, J. T.; Hansen, A. M.; Beck, H. C. (2010). Oat (*Avena sativa*) seed extract as an antifungal food preservative through the catalytic activity of a highly abundant class I chitinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6), 1573–1584.

Stanford, A.; Bevan, M.; Northcote, D. (1989). Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato. *Mol Gen Genet*, 215, 200-208.

Studier, F. W.; Moffatt, B. A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Journal Molecular Biology*, 189, 113-130.

Studier, F. W.; Daegelen, P.; Lenski, R. E.; Maslov, S.; Jihyun F. Kim, J. F. (2009). Understanding the Differences between Genome Sequences of Escherichia coli B Strains REL606 and BL21(DE3) and Comparison of the E. coli B and K-12 Genomes. *Journal of Molecular Biology*, 394, 653–680.

Svensson, B.; Svendsen, I.; Hojrup, P.; Roepstorff, P.; Ludvigsen, S.; Poulsen, F.M. (1992). Primary structure of Barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry*, 31, 8767–8770.

Tabor, S.; Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 1074-1078.

Taira, T.; Ohnuma, T.; Ymagami, A.; Aso, Y.; Ishiguro, M.; Ishihara, M. (2002). Antifungal Activity of Rye (*Secale cereale*) Seed chitinases: The Different Binding Manner of Class I Class II Chitinases to the Fungal Cell Walls. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66 (5), 970-977.

Takakura, Y.; Ito, T.; Saito, H.; Inoue, T.; Komari, T.; Kuwata, S. (2000). Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 42, 883–897.

Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S. (2003). Toll-Like Receptors. *Annual Review Immunology*, 21, 335–76.

Tavares, L. S. C. (2012) Isolamento e caracterização molecular do gene que codifica para uma proteína PR-4 da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, (72), 211–222.

Timperio, A. M.; Egidi, M. G., Zolla, L. (2008). Proteomics Applied on Plant Abiotic Stresses: Role of Heat Shock Proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71, 391 – 411.

Tobimatsu, Y., Wagner, A., Donaldson, L., Mitra, P., Niculaes, C., Dima, O., Kim, J. I., Anderson, N., Loque, D., Boerjan, W., Chapple, C., Ralph, J. (2013). Visualization of plant cell wall lignification using fluorescence-tagged monolignols. *The Plant Journal*, 76, 357–366.

Tremacoldi, C. R. Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle. – Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental, 2010

Trudel, J.; Asselin, A.(1989). Detection of Chitinase Activity after Gel Electrophoresis Polyacrylamide. *Analytical Biochemistry*, 178, 362-366.

Trudel, J.; Audy, P.; Asselin, A. (1989). Electrophoretic Forms of Chitinases Activity in Xanthi-nc Tobacco, Healthy and Infected With Mosaic Virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2(6), 315-324.

Turvey, S. E.; Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125 (2), 24-32.

Vallejo, L. F.; and Ursula Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, doi:10.1186/1475-2859-3-11

Van der Hoorn, R. A. L.; De Wit, P. J. G. M.; Joosten, M. H. A. J. (2002). Balancing Selection Favors Guarding Resistance Proteins. *TRENDS in Plant Science*, 7, 67-71.

Van Loon, L. C. (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 4, 111-116.

Van Loon, L. C.; Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85–97.

Van Loon, L.C.; Van Kammen A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var ‘Samsun’ and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40: 199-211.

Van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–162.

- Van Loon, L.C. (1999). Occurrence and Properties of Plant Pathogenesis-Related Proteins. In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds). *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press LLC, Boca Raton, pp 1-18.
- Van Parijs, J.; Broekaert, W.F.; Goldstein, I.J.; Peumans, W.J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 183, 258–264.
- Villaverde, A.; Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, 25, 1385–1395.
- Wally, O.; Punja, Z. K. (2010). Genetic Engineering for Increasing fungal and Bacterial Disease Resistance in Crop Plants. *GM Crops*. 1, 199-206.
- Walters, D. R.; Ratsep, J.; Havis, N. H. (2013). Controlling Crop Diseases Using Induced Resistance: Challenges for the Future. *Journal of Experimental Botany*, 64, 1263–1280.
- Wang, N.; Xiao, B.; Xiong, L. (2011). Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2212– 2224.
- Wang, S. Y.; Ye, X. Y.; Chen, J.; Rao, P. F. (2012). A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. *Food Research International*, 45, 116–122.
- Watson, J. D. *DNA: O segredo da vida*. 1º edição. Companhia das letras, 2005, São-Paulo. 480 p.
- Williams, D. B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 119, 615-623.
- Xiong, L.; Schumaker, K. S.; Zhu, J. K. (2002). Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*, Supplement 2002, 165–183.
- Xiong, L.; Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 31–139.
- Yu, X. M.; Griffith, M.; Wiseman, S. B. (2001). Ethylene Induces Antifreeze Activity in Winter Rye Leaves. *Plant Physiology*, 126, 1232-1240.
- Zhang, J.; Kopparapu, N. K.; Yan, Q.; Yang, S.; Jiang, Z. (2013). Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. *Food Chemistry*, 138, 1225–1232.

Zhu, T.; Song, F.; Zheng, Z. (2006). Molecular Characterization of the Rice Pathogenesis-related Protein, OsPR-4b, and Its Antifungal Activity Against *Rhizoctonia solani*. *Journal Phytopathology* 154, 378–384.

Zipfel, C.; Robatzek, S.; Navarro, L.; Oakeley, E. J.; Jones, J. D. G.; Felix, G.; Boller, T. (2004). Bacterial Disease Resistance in *Arabidopsis* Through Flagellin Perception. *Nature*, 428, 764-767.

Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition Receptors in Plant Innate Immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20:10–16.

Zipfel, C. (2009). Early Molecular Events in PAMP-triggered Immunity. *Current Opinion in Plant Biology* , 12, 414–420.