



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TARCYMARA BARATA GARCIA

**EXPRESSÃO GÊNICA, LOCALIZAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL E ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS LIGANTES À QUITINA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE DE *Moringa oleifera***

FORTALEZA

2018

TARCYMARA BARATA GARCIA

EXPRESSÃO GÊNICA, LOCALIZAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL E ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS LIGANTES À QUITINA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE DE *Moringa oleifera*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Coorientadora: Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G211e Garcia, Tarcymara Barata.
Expressão gênica, localização espaço-temporal e atividade antifúngica de proteínas ligantes à quitina durante o desenvolvimento e germinação da semente de Moringa oleifera / Tarcymara Barata Garcia. – 2019. 65 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Coorientação: Prof. Dr. Ilka Maria Vasconcelos.

1. Albumina 2S. 2. Atividade antifúngica. 3. M. oleifera. 4. Proteína ligante à quitina. I. Título.

CDD 572

TARCYMARA BARATA GARCIA

EXPRESSÃO GÊNICA, LOCALIZAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL E ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS LIGANTES À QUITINA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE DE *Moringa oleifera*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 09/11/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Maria Izabel Gallão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Hélio Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Emilson Cardoso
Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

À coordenação e ao corpo docente do Programa pela formação de recursos humanos qualificados ao exercício de docência e pesquisa científica. Meus sinceros agradecimentos pela dedicação na construção do saber científico.

Aos chefes e alunos do LabTox (Laboratório de Proteínas Tóxicas) e LPVD (Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa) pela infraestrutura concedida, apoio nos procedimentos experimentais e ensinamentos técnicos-científicos. À Prof.^a Ilka Maria Vasconcelos e ao Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira pela valiosa oportunidade de receber suas orientações científicas, pelas suas condutas profissionais e dedicação durante todos estes anos de trabalho árduo. Sinto-me honrada e grata pela confiança em participar dos seus grupos de pesquisa. Também lhes dedico minha admiração por serem pessoas generosas que se dispõem a entender e ajudar seus alunos nos momentos difíceis. À Prof.^a Daniele Sousa por seu otimismo e alegria contagiantes, e todo incentivo durante o curso. As bolsistas de pós-doutorado Lady Clarissa e Helen Costa por todos os ensinamentos durante momentos cruciais que antecederam à qualificação e defesa da tese. Minha grande admiração não somente pela inteligência, mas, também, por desenvolverem com muito gosto e competência as atividades que lhes são desafiadas. Minha gratidão por tudo o que fizeram por mim e, especialmente, pela nossa amizade. Aos alunos e amigos dos referidos laboratórios por todo carinho e convivência. Muito além da Ciência da Vida, aprendi o que de fato nos move como seres humanos: o amor! Obrigada a todos (Amanda, Ana Paula, Dhel, Ivna, Helen, Lady, Larissa, Letícia, Lucas, Luiz, Paulo, Mariana, Marina, Nadine, Queilane, Raíssa, Tiago Deiveson, Thiago, Xavier, Yara) pela paciência e conselhos, especialmente nos momentos mais delicados.

Ao Laboratório de Morfologia e Anatomia Vegetal pela infraestrutura concedida, sob coordenação da Prof^a Arlete Soares, a quem sou muito grata pelas suas valiosas instruções e por sua colaboração nos experimentos de anatomia vegetal. Agradeço também a sua equipe por toda gentileza e atenção.

Ao Laboratório de Bioenergética Vegetal, pela infraestrutura concedida, sob chefia do Prof. José Hélio Costa, a quem agradeço imensamente pela colaboração científica e por todo apoio prestado durante a qualificação do projeto de tese.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela infraestrutura concedida, sob coordenação do Prof. Francisco Campos. Meus sinceros agradecimentos a sua equipe de alunos pelo apoio nos experimentos de PCR. Agradeço também o incentivo e a atenção de

Domingos, Emanoella, Fabiano, Magda, Moabe, Raquel e Roberto.

À Central Analítica da UFC pela infraestrutura e apoio nas análises microscópicas.

Aos meus pais Tarcízio e Maria, a minha irmã Tarcyane e sua família (Tino e Isabella) e a todos os membros das famílias Barata e Garcia, a quem devo toda a minha formação de caráter. Sou grata a Deus pela família amorosa que Ele me concedeu, na qual encontrei o apoio necessário para minhas conquistas pessoais, não chegaria tão longe se não fosse pela dedicação de vocês. Obrigada pela força e compreensão em todas as etapas da minha vida, inclusive na trajetória da graduação, mestrado e doutorado. Aos meus eternos amigos do Museu Goeldi, serei sempre grata por todos os momentos e aprendizagem neste lugar. Aos meus amigos que os considero como irmãos Emilyn, Jadilson e Eline, as palavras não conseguem expressar o tamanho da minha gratidão pelos sábios conselhos, incentivo e carinho. Aos irmãos da Igreja Amigos de Cristo, pelas palavras de encorajamento e ânimo, abraços de paz e bons momentos reunidos como uma família em Cristo. A todos da família e amigos, meu amor e gratidão!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de doutorado e de fomentos à pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Sementes acumulam grandes quantidades de proteínas como fonte de carbono, nitrogênio, enxofre e aminoácidos, que são requeridos durante o desenvolvimento inicial da planta. As albuminas 2S formam uma importante classe de proteínas de reserva em sementes, tendo múltiplas atividades, tais como inibitória de proteases, antibacteriana e antifúngica. Neste sentido, as albuminas 2S são potencialmente estudadas como via de controle de doenças em culturas vegetais economicamente importantes, uma vez que os compostos convencionais utilizados para este fim apresentam custos elevados e danos ao ambiente. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem investigando proteínas ligantes à quitina (*Mo*-CBPs) purificadas das sementes quiescentes de *Moringa oleifera*, que integram a família das albuminas 2S. As *Mo*-CBPs exibem potente atividade contra fungos fitopatogênicos. O presente estudo teve por objetivo investigar a expressão gênica, a localização espaço-temporal e possível atividade antifúngica das *Mo*-CBPs ao longo do desenvolvimento e germinação da semente de *M. oleifera*. Quatro estágios do desenvolvimento da semente, contados em dias após a antese (DAA) foram estudados e identificados como seguem: embrião globular (15 DAA); embrião cordiforme (30 DAA); embrião em maturação (60 DAA); e embrião maduro (90 DAA). A localização *in situ* das *Mo*-CBPs também foi investigada nos tecidos da semente em germinação, sendo considerados quatro estágios: 24, 48, 72 e 96 horas após a semeadura (HAS). O acúmulo de transcritos de *Mo*-CBPs e suas proteínas correspondentes não foram detectadas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (15 e 30 DAA). Porém, eles se expressaram, intensamente, nos estágios finais de maturação da semente, com maior acúmulo aos 60 DAA. As *Mo*-CBPs foram detectadas nos últimos estágios de desenvolvimento da semente (60 e 90 DAA) e a análise de localização *in situ* revelou que estas proteínas formam densos depósitos nos vacúolos dos cotilédones da semente madura (90 DAA). As *Mo*-CBPs não foram detectadas nas sementes em 72 e 96 HAS, indicando que tais proteínas foram degradadas durante o processo germinativo. As *Mo*-CBPs apresentaram atividade inibitória sobre a germinação de esporos de três espécies de *Fusarium*. Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos obtidos para albuminas 2S de outras espécies de Brassicales e sugerem, também, que as *Mo*-CBs desempenham um duplo papel, como proteínas de armazenamento e defesa de sementes de *M. oleifera*.

Palavras-chave: Albumina 2S. Atividade antifúngica. *M. oleifera*. Proteína ligante à quitina.

ABSTRACT

Seeds accumulate great amounts of proteins that are used as source of carbon, nitrogen, sulfur, and amino acids required during the initial development stages of plants. The 2S albumin family encompasses storage proteins that in addition have other activities like inhibition of proteolytic enzymes and antibacterial and antifungal compounds. Due its biological properties, 2S albumins stand out for their potential to combat plant diseases in economically important crops. In place of commercial compounds that are costly and cause environmental pollution. Aware of these problems, our research group has been investigating the chitin binding proteins purified from *Moringa oleifera* quiescent seeds (*Mo*-CBPs) that also belong to the 2S albumins family. *Mo*-CBPs present a potent activity against phytopathogenic fungi. The present work aims to assess the gene expression, spatio-temporal localization and possible antifungal activity of *Mo*-CBPs during *Moringa oleifera* seed development and germination. During *M. oleifera* seed maturation, four stages of development, counted in days after anthesis (DAA), were studied: globular embryo (15DAA); heart-shaped embryo (30 DAA); cotyledonary embryo prior dissection (60 DAA); and cotyledonary embryo after dissection (90 DAA). Accumulation of *Mo*-CBPs transcripts and corresponding proteins were not detected in the initial stages of embryonic development (15 and 30 DAA). However, their transcripts were intensely expressed in the final seed maturation stages, particularly at 60 DAA. The presence of *Mo*-CBPs assessed by ELISA was detected only in the last stages of seed maturation (60 and 90 DAA). *Mo*-CBPs *in situ* localization analyses showed their strong presence into vacuolar structures in the cotyledons of mature seeds (90 DAA). During germination, immunohistochemistry analyses revealed a degradation pattern of *Mo*-CBPs. Antifungal activity assay indicated that *Mo*-CBPs are active in the last stages of seed maturation. They inhibited the spore germination of three *Fusarium* species. All together, these results are similar to data obtained for other 2S albumins belonging to Brassicales. These results also suggest that *Mo*-CBPs play a dual role as storage and defense proteins in the seeds of *M. oleifera*.

Key words: 2S albumin. Antifungal activity. *M. oleifera*. Chitin binding protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Armazenamento de proteínas de reserva (SSPs) em sementes representativas de angiospermas	15
Figura 2	– Esquema representativo do processo de biossíntese e transporte das proteínas de reserva em sementes (SSPs)	17
Figura 3	– Esquema estrutural da quitina e da parede celular dos fungos	20
Figura 4	– Estruturas esquemáticas de formas típicas e variantes das albuminas 2S de plantas	23
Figura 5	– Hábito, partes vegetativas e reprodutivas de <i>M. oleifera</i> Lam	25
Figura 6	– Representação estrutural da isoforma <i>Mo</i> -CBP ₃ -1, com base na estrutura cristalográfica	27
Figura 7	– Alinhamento das sequências de aminoácidos da isoforma <i>Mo</i> -CBP ₃ -3 e de albuminas 2S de plantas	28
Figura 8	– <i>Moringa oleifera</i> fruit and seed at different developing stages	41
Figura 9	– SEM and optical micrographs of a representative <i>Moringa oleifera</i> seed at different developmental stages	42
Figura 10	– Relative expression pattern of genes that encode <i>Mo</i> -CBPs during the <i>Moringa oleifera</i> seed development	43
Figura 11	– Immunological cross-reactivity analysis and partial purification of <i>Mo</i> -CBPs from <i>M. oleifera</i> seed	44
Figura 12	– <i>In situ</i> localization of <i>Mo</i> -CBPs in a representative <i>Moringa oleifera</i> seed at different developing stages by confocal laser scanning microscopy	46
Figura 13	– Stereomicroscope photographs of a representative <i>M. oleifera</i> seed showing changes in the embryo during germination	46
Figura 14	– <i>In situ</i> localization of <i>Mo</i> -CBPs in the cotyledon cells of a representative <i>Moringa oleifera</i> seed during germination	47

Figura 15 – Antifungal activity of <i>Mo</i> -CBPs on spore germination	48
Figura 16 – Optical micrographs showing the absence of growth inhibition of fungi incubated with protein fractions isolated from <i>M. oleifera</i> seeds	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Peptídeo antimicrobiano (<i>antimicrobial peptide</i>)
CBD	Domínio ligante à quitina (<i>chitin-binding domain</i>)
GlcNac	β -(1,4)- <i>N</i> -acetil-D-glucosamina
LTP	Proteína transferidora de lipídeo (<i>lipid transfer protein</i>)
8CM	Motivo cisteínico 8 (<i>eight cysteine motif</i>)
Proteína PR	Proteína relacionada à patogênese (<i>pathogenesis-related protein</i>)
PSV	Vacúolo de reserva proteica (<i>protein storage vacuole</i>)
SSP	Proteína de reserva em sementes (<i>seed storage protein</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Proteínas de reserva em sementes: classificação, biossíntese e armazenamento	15
2.2	Proteínas antifúngicas em sementes vegetais	18
2.3	Proteínas da família albumina 2S: estrutura e biossíntese	21
2.4	Proteínas ligantes à quitina: classificação e estrutura	22
2.5	Sementes de <i>Moringa oleifera</i> : fonte de CBPs antifúngicas	24
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	ARTIGO REFERENTE À TESE	30
4.1	Introduction	31
4.2	Material and methods	33
4.2.1	<i>Biological materials and chemical reagents</i>	33
4.2.1	<i>Biological materials and chemical reagents</i>	33
4.2.2	<i>Histological characterization</i>	34
4.2.3	<i>Gene expression analysis</i>	35
4.2.3.1	<i>RNA extraction</i>	35
4.2.3.2	<i>Quantitative real time PCR</i>	35
4.2.4	<i>Mo-CBPs and protein fraction preparation</i>	36
4.2.5	<i>Cross-reactivity of the polyclonal antibodies raised against Mo-CBP₄ with Mo-CBP₂, Mo-CBP₃, and Mo-CBP₄</i>	38
4.2.6	<i>Assessment of Mo-CBPs by ELISA</i>	38
4.2.7	<i>In situ localization of Mo-CBPs</i>	39
4.2.8	<i>Antifungal activity</i>	39
4.2.9	<i>Statistical analysis</i>	40
4.3	Results	40
4.3.1	<i>Histology of developing M. oleifera seed</i>	40
4.3.2	<i>Gene expression pattern of Mo-CBPs during the seed development</i>	43
4.3.3	<i>Cross-reactivity between Mo-CBP₂, Mo-CBP₃, and Mo-CBP₄ isoforms against the polyclonal antibodies raised against Mo-CBP₄</i>	43

4.3.4	<i>Detection and quantification of Mo-CBPs in the protein fractions from M. oleifera seeds</i>	43
4.3.5	<i>In situ localization of Mo-CBPs in M. oleifera seeds</i>	45
4.3.6	<i>Inhibition of Fusarium spp. spore germination by the protein fractions from M. oleifera seeds</i>	47
4.4	Discussion	48
5	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

As sementes estocam carbono na forma de carboidratos, lipídios e proteínas que se acumulam durante uma fase crucial do desenvolvimento vegetal e representam o principal valor nutricional dos grãos. As proteínas de reserva perfazem até 50% do total protéico em sementes maduras, constituindo-se numa importante fonte de nutrientes para a dieta animal, incluindo o homem. Como função biológica primordial, as proteínas de reserva fornecem nitrogênio, enxofre e aminoácidos que são mobilizados durante a germinação e estágio pós-germinativo até que os órgãos da plântula estejam fotossinteticamente ativos. Além do seu papel de reserva molecular, estas proteínas comumente são ativas contra diversos microrganismos patogênicos, principalmente fitopatógenos, sugerindo sua participação na defesa vegetal (SHEWRY; HALFORD, 2002). As proteínas de reserva em sementes como moléculas multifuncionais são vistas como novas ferramentas biotecnológicas, especialmente na área da saúde e da agricultura. Assim, o potencial destas moléculas tem sido intensamente explorado para fins de geração de medicamentos mais eficazes a baixo custo e na produção de plantas transgênicas resistentes ao ataque de patógenos, reduzindo, assim, a necessidade de aplicação de pesticidas (CÂNDIDO *et al.*, 2011).

Dentre as proteínas de reserva encontradas nas sementes, as albuminas 2S destacam-se como um grupo de moléculas estruturalmente diverso, conhecido, em geral, por suas propriedades alergênicas, emulsificantes, inibitórias de enzimas proteolíticas, antibacterianas e antifúngicas (MARIA-NETO *et al.*, 2011). A expressiva atividade contra fungos fitopatogênicos das albuminas 2S, assim como de outras proteínas de reserva, tem estimulado o uso destas moléculas como uma estratégia alternativa de controle de doenças em plantas, em detrimento à prática intensiva de fungicidas convencionais. Os efeitos desta última prática, como danos à saúde humana e ao meio ambiente, bem como o surgimento de linhagens de fungos resistentes, têm incentivado a busca por novas biomoléculas fungitóxicas de variadas fontes vegetais (YAN *et al.*, 2015). Neste contexto, *Moringa oleifera* Lam. representa uma potencial fonte de proteínas da família albumina 2S com relevante atividade antifúngica.

M. oleifera é a espécie mais conhecida da família Moringaceae, especialmente pelo uso das suas sementes na purificação de água. No tratamento da água turva, proteínas catiônicas com baixa massa molecular presentes na semente de *M. oleifera* são os agentes ativos na coagulação de partículas e microrganismos em suspensão (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; NDABIGENGESERE *et al.*, 1995). Além da propriedade coagulante, tais proteínas

apresentam atividade antibacteriana, incluindo espécies patogênicas ao homem, como *Escherichia coli* (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). A partir destes estudos iniciais, diversas proteínas têm sido isoladas da semente de *M. oleifera*. Tais proteínas exibem amplo espectro de ação contra patógenos, dentre as quais se encontram peroxidases, inibidores de proteases serínica, lectinas (SANTOS *et al.*, 2009; BIJINA *et al.*, 2011; SHANK *et al.*, 2013) e proteínas ligantes à quitina. Estas últimas denominadas *Mo*-CBPs em referência à designação inglesa “chitin-binding proteins from *M. oleifera* seeds”.

Nosso grupo de pesquisa foi responsável pela purificação e descoberta da atividade antifúngica das *Mo*-CBPs. A capacidade das *Mo*-CBPs de se ligarem à quitina foi identificada durante seu processo de purificação, quando da utilização da matriz de quitina, como suporte de afinidade. No procedimento subsequente, usando uma matriz trocadora de cátions, foram isoladas as isoformas *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃ e *Mo*-CBP₄, nomeadas de acordo com a sua ordem de eluição (NETO *et al.*, 2017). A sequência de aminoácidos e caracterização estrutural de *Mo*-CBP₃ evidenciou a alta identidade desta proteína com membros da família albumina 2S (FREIRE *et al.*, 2015; ULLAH *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, as albuminas 2S são codificadas por uma família multigênica gerando diversas isoformas, após processamento proteolítico (MORENO; CLEMENTE, 2008; CÂNDIDO *et al.*, 2011). Por esta razão, foi levantada a hipótese de que as *Mo*-CBPs são típicas albuminas 2S, mas com um sítio ligante à quitina.

Mo-CBP₂ e *Mo*-CBP₄ destacaram-se por uma pronunciada atividade contra fungos patogênicos ao homem. A primeira proteína mostrou-se ativa contra espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) (NETO *et al.*, 2017), enquanto que, a última mostrou atividade contra o dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* (LOPES, 2016). A ação contra fungos fitopatogênicos foi investigada apenas para *Mo*-CBP₃. Esta proteína, nas concentrações finais de 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, mostrou atividade inibitória sobre a germinação de esporos de *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloesporioides* (GIFONI *et al.*, 2012). Considerando que nenhuma das *Mo*-CBPs possui atividade quitinolítica, seu efeito inibitório no desenvolvimento dos fungos provavelmente se deve à interação do seu domínio ligante à quitina com este carboidrato reconhecidamente presente na parede celular destes fungos. Além disso, conforme observado por Gifoni *et al.* (2012), a presença de quitina na parede destes fungos é crucial para a atividade das *Mo*-CBPs, baseando-se na constatação de que *Mo*-CBP₃ não afetou a germinação de esporos do oomiceto *Pythium oligandrum*, no qual a quitina é um componente minoritário ou ausente na parede celular. É importante ressaltar que, até o momento, a atividade antifúngica de proteínas

isoladas de *M. oleifera* tem sido relatada apenas para peptídeos tipo-heveína isolados das folhas da planta (KINI *et al.*, 2017) e *Mo*-CBPs.

A motivação inicial do presente estudo foi investigar a expressão dos genes que codificam as *Mo*-CBPs em associação com o acúmulo das proteínas correspondentes, durante o desenvolvimento da semente de *M. oleifera*, como contribuição ao conhecimento de sua função primordial como proteínas de reserva. Além disso, buscou-se entender o papel da atividade antifúngica das *Mo*-CBPs, considerando a hipótese de que estas proteínas têm, também, papel de defesa vegetal. Neste sentido, o acúmulo das *Mo*-CBPs foi avaliado em alguns estágios do desenvolvimento da semente de *M. oleifera* em associação com a capacidade delas inibirem o crescimento de fungos fitopatogênicos. Assim, tendo como premissa a hipótese da dupla função fisiológica das *Mo*-CBPs, reserva e defesa, os seguintes questionamentos nortearam a condução do presente trabalho:

- Qual é o padrão de expressão dos genes codificantes para as *Mo*-CBPs, durante o desenvolvimento da semente de *M. oleifera*?

- Como variam os teores e qual o padrão de acúmulo das *Mo*-CBPs nos tecidos, ao longo do desenvolvimento da semente de *M. oleifera*?

- Tendo em vista sua função de reserva, em quais fases da germinação da semente as *Mo*-CBPs são degradadas e mobilizadas como suporte nutricional para o desenvolvimento inicial da planta?

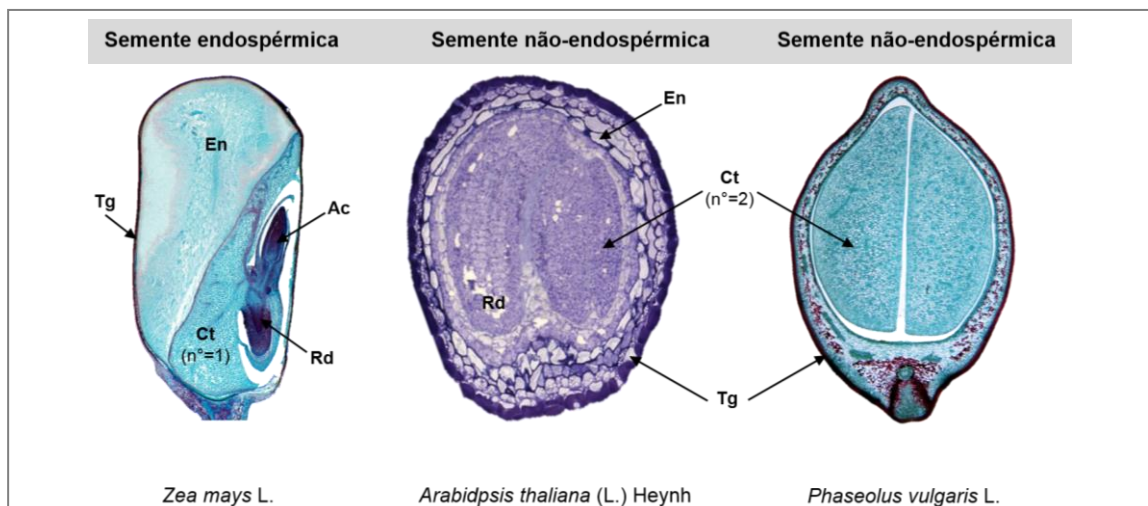
- Tendo em vista sua função de defesa, em quais fases do desenvolvimento da semente as *Mo*-CBPs mostram-se ativas contra fungos fitopatogênicos, sendo capazes de interferir no processo da germinação de seus esporos?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas de reserva em sementes: classificação, biossíntese e armazenamento

Em certas angiospermas, especialmente nas dicotiledôneas, o endosperma (albúmen) é completamente consumido pelo embrião em desenvolvimento acarretando na ausência deste tecido de reserva na semente madura, como é o caso de *M. oleifera*. Em outros casos, como em *Arabidopsis thaliana*, apenas uma camada remanescente de células do endosperma está presente na semente madura. Nas sementes não-endospérmicas ou exalbuminosas, nas quais o endosperma é ausente ou residual, os cotilédones são os principais tecidos armazenadores de substâncias como açúcares, lipídios e proteínas. Nas sementes endospérmicas ou albuminosas, por sua vez, o endosperma constitui o principal tecido de armazenamento de substâncias nutritivas ocupando um grande volume da semente madura, como ocorre na maioria das monocotiledôneas. Este processo de síntese e acúmulo de grandes quantidades de proteínas nas sementes é essencial à manutenção do ciclo de vida das plantas superiores (VERDIER; THOMPSON, 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Armazenamento de proteínas de reserva (SSPs) em sementes representativas de angiospermas. Em *Z. mays*, uma monocotiledônea, o endosperma (En) ocupa a maior proporção da semente, sendo o principal tecido armazenador das SSPs, representadas, majoritariamente, por prolaminas. Em *A. thaliana*, uma dicotiledônea não-endospérmica, o En remanescente é formado por apenas uma camada de células periféricas. Estas estão envolvidas, também, no armazenamento das SSPs, que são depositadas, preferencialmente, nos cotilédones (Ct). Em *P. vulgaris*, também uma dicotiledônea não-endospérmica, os cotilédones são os principais tecidos de acúmulo das SSPs, representadas, principalmente pelas albuminas e globulinas. Ac (ápice caulinar), Rd (radícula), Tg (tegumento).



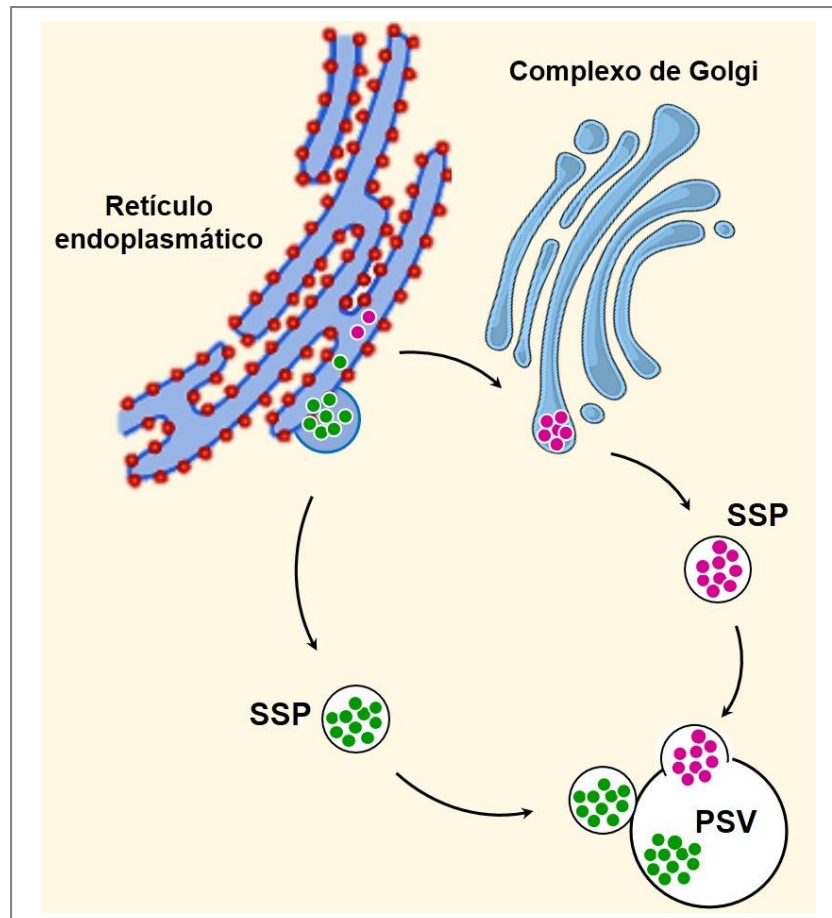
Fonte: elaborada pelo autor.

As proteínas de reserva em sementes foram inicialmente classificadas por Osborne (1924) de acordo com a solubilidade em diferentes solventes: albuminas em água, globulinas em solução salina, prolaminas em solução de água/álcool e glutelinas em solução ácida ou alcalina. Em geral, as albuminas e globulinas são as proteínas de reserva mais abundantes das sementes de dicotiledôneas. Nas sementes das monocotiledôneas, as proteínas de reserva acumuladas predominantemente no endosperma, consistem principalmente de prolaminas, exceto no caso de alguns cereais como aveia e arroz, nos quais as glutelinas são mais abundantes (VERDIER; THOMPSON, 2018). As proteínas de reserva foram posteriormente classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação (S_{20w}) por centrifugação em gradiente de sacarose: albuminas 2S (coeficiente 2) e globulinas 7-11S (coeficiente 7 ou 11) (YOULE; HUANG, 1981). Estudos comparativos mais abrangentes das sequências de aminoácidos das SSPs mostraram relações estruturais e evolutivas entre estas classes de proteínas, definindo as albuminas 2S como integrantes da superfamília prolamina (SHEWRY; HALFORD, 2002).

As SSPs são codificadas por famílias multigênicas. Diversas isoformas, notavelmente diferentes nas suas propriedades estruturais e biológicas, são originadas por meio de complexas modificações pós-traducionais, principalmente processamento proteolítico. As SSPs são sintetizadas como uma cadeia polipeptídica precursora cotraducionalmente transportada para o lúmen do retículo endoplasmático via peptídeo sinal. Após a clivagem desta sequência sinal, enzimas e chaperonas do retículo endoplasmático medeiam o dobramento do polipeptídeo precursor, o qual segue por uma rota independente ou dependente do complexo de Golgi. Finalmente, a proteína precursora é transportada para organelas específicas de reserva onde será processada, gerando a proteína madura. Estes compartimentos finais da rota biossintética das SSPs, denominados vacúolos de reserva proteica (PSVs), são agregados de vesículas originadas do complexo de Golgi ou diretamente do retículo endoplasmático (MORENO; CLEMENTE, 2008) (Figura 2).

As proteínas de reserva em sementes (SSPs) são rapidamente degradadas durante o processo germinativo, fornecendo nutrientes necessários para o desenvolvimento da próxima geração esporofítica. Na semente madura, as SSPs podem permanecer em um estado osmoticamente inativo por um longo período nos vacúolos de reserva até serem requeridas para a germinação subsequente. Esta compartimentalização das SSPs nos vacúolos de reserva é um importante mecanismo de proteção contra sua degradação prematura por enzimas proteolíticas, que também, são acumuladas nos últimos estágios de maturação da semente.

Figura 2 - Esquema representativo do processo de biossíntese e transporte das proteínas de reserva em sementes (SSPs). As SSPs são sintetizadas na forma de uma cadeia polipeptídica precursora que é transportada para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) durante a tradução. Após formação de pontes S-S e dobramento do polipeptídeo no RE, a proteína precursora segue por uma rota independente ou dependente do complexo de Golgi. Finalmente, a forma precursora é transportada para compartimentos específicos de reserva, os vacúolos de reserva proteica (PSVs), onde a mesma é processada em uma proteína madura.



Fonte: elaborada pelo autor.

Durante a germinação, em decorrência da ativação das proteases, as SSPs são degradadas fornecendo carbono, nitrogênio, enxofre e aminoácidos que podem ser reciclados no processo de biossíntese *de novo*, servindo, primariamente, à função de alocação de nutrientes durante o desenvolvimento inicial da planta (MÜNTZ *et al.*, 2001). Além de reserva, estas proteínas podem ter um papel fundamental na defesa vegetal, apresentando um espectro excepcional de atividade contra bactérias e fungos fitopatogênicos, destacando-se diversas vicilinas (globulinas 7S) e albuminas 2S (CÂNDIDO *et al.*, 2011).

2.2 Proteínas antifúngicas em sementes vegetais

As plantas apresentam sofisticados mecanismos para proteger seus tecidos de infecções causadas por fungos, considerados os principais promotores de doenças em vegetais e perdas econômicas relevantes na produção de grãos. Parte deste sistema de defesa vegetal inclui barreiras físicas e químicas pré-formadas, como cera, cutina, suberina, lignina, celulose, tricomas, proteínas, dentre outras (FERREIRA *et al.*, 2007). Na semente em germinação, as barreiras físicas geralmente são destruídas durante a absorção de água e a consequente ruptura dos tegumentos pode tornar o embrião vulnerável ao ataque de patógenos. Como forma de evitar ou neutralizar a invasão de seus tecidos por fungos fitopatogênicos, as sementes sintetizam uma variedade de proteínas que podem interagir com componentes da superfície celular ou alvos intracelulares, afetando o desenvolvimento e, em alguns casos, levando o microrganismo à morte (BECKER-RITT; CARLINI, 2012; PARK *et al.*, 2017).

Peptídeos e polipeptídeos antifúngicos de origem vegetal estão distribuídos em diferentes famílias de acordo com sua estrutura espacial e/ou função, incluindo AMPs, peptídeos tipo-heveína, albuminas 2S, β -1,3-glucanases, inibidores de proteases, lectinas, peroxidases, proteínas ligantes à quitina, LTPs, quitinases, ureases e vicilinas (THEIS; STAHL, 2004; NAWROT *et al.*, 2014). Inibidores de proteases e lectinas são encontrados tanto em tecidos vegetativos como em sementes. Em contraste, albuminas 2S e vicilinas são encontradas, exclusivamente, em tecidos de reserva da semente (CÂNDIDO *et al.*, 2011).

Os primeiros estudos considerando albuminas 2S como uma potente classe de antifúngicos foram realizados por Terras *et al.* (1992, 1993). Em experimentos *in vitro*, os autores demonstraram atividade antifúngica de albuminas 2S de cinco espécies de Brassicaceae (*Raphanus sativus*, *Brassica napus*, *B. rapa*, *Sinapis alba*, *A. thaliana*). Desde então, a propriedade antifúngica de albuminas 2S tem sido intensamente prospectada em diferentes fontes vegetais como *Arachis hypogaea* (Leguminosae), *Capsicum annuum* (Solanaceae), *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae), *Malva parviflora* (Malvaceae), *P. edulis f. flavicarpa* (Passifloraceae), *Taraxacum officinale* (Asteraceae) e *M. oleifera* (Moringaceae) (AGIZZIO *et al.*, 2006; PELEGRINI *et al.*, 2006; ODINTSOVA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012; DUAN *et al.*, 2013; TOMAR *et al.*, 2014 b; GIFONI *et al.*, 2012; NETO *et al.*, 2017).

Considerando que algumas albuminas 2S de plantas apresentam efeito tóxico para diversos fitopatógenos, especula-se que estas proteínas estão envolvidas na defesa vegetal. Ribeiro *et al.* (2011) observaram que um peptídeo tipo-albumina 2S de *Passiflora alata* inibia o crescimento do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. Contudo, este

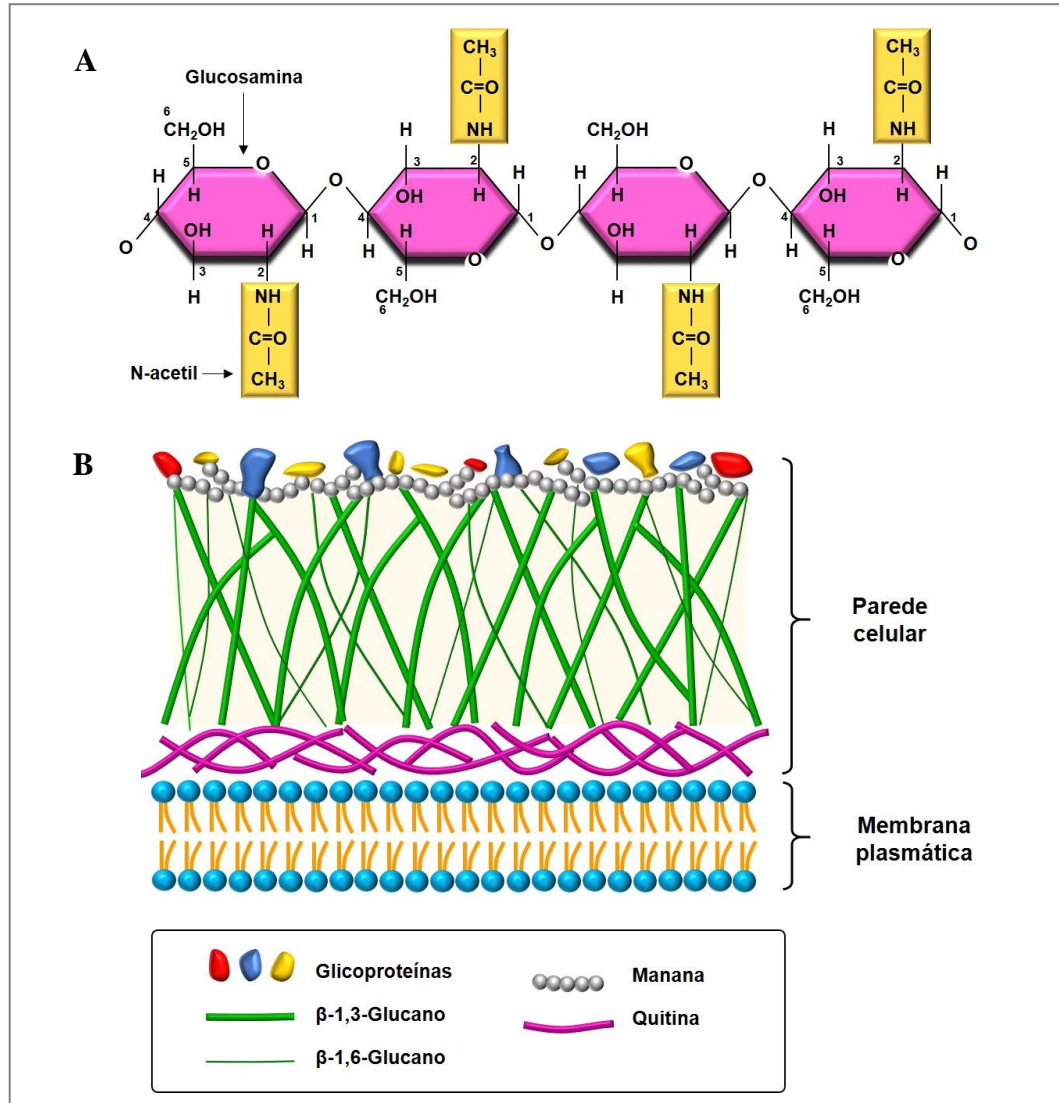
peptídeo se mostrou inativo contra bactéria e fungos patogênicos ao homem. Yan *et al.* (2007) observaram que em tabaco transgênico, a expressão do gene que codifica o peptídeo tipo-albumina 2S isolado de *Leonurus japonicus* aumentou a resistência da planta às doenças causadas pelo fungo *Alternaria alternata* e pela bactéria *Ralstonia solanacearum*.

O mecanismo de ação antifúngica das albuminas 2S ainda é pouco conhecido. Entretanto, as investigações apontam principalmente para danos causados à membrana das células fúngicas, levando à permeabilização e extravasamento dos componentes celulares. Tais efeitos foram mostrados, por exemplo, por Terras *et al.* (1993), sendo causados pela atividade sinérgica da albumina 2S de *R. sativus* e tioninas isoladas de trigo ou cevada. Além disso, estudos mais recentes reportam que as albuminas 2S provocam alterações morfofisiológicas e induzem à formação de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas, resultando em um efeito fungistático ou fungicida (AGIZZIO *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2017).

Outras proteínas que merecem atenção pelo seu potencial antifúngico são aquelas capazes de interagir com açúcares da parede celular dos fungos, especialmente com quitina, um homopolímero linear de resíduos de GlcNac (Figura 3A), e β -1,3-glucanas. A base estrutural da parede celular dos fungos é formada por uma rede tridimensional rígida de microfibrilas de quitina ligadas covalentemente à β -1,3-glucanas (Figura 3B). Nos fungos filamentosos, estes polissacarídeos são sintetizados pela membrana plasmática e sua incorporação à parede celular parece estar limitada às extremidades das hifas. A quitina destaca-se como o principal componente da parede celular fúngica, perfazendo 2 a 10% da massa seca respectivamente em leveduras e fungos filamentosos (LENARDON *et al.*, 2010).

A ausência de quitina, bem como, a presença de uma variedade de proteínas ligantes à quitina em plantas, sugere a participação destas moléculas na defesa vegetal. As proteínas ligantes à quitina podem inibir o crescimento de fungos em concentrações proteicas iguais ou inferiores a 1 $\mu\text{g/mL}$. Acredita-se que o efeito inibitório ocorre devido à ligação da proteína com a quitina da parede celular do fungo. Esta interação, acumulando-se no septo e ápice das hifas, provoca alterações no padrão de ramificação, levando à formação de protuberâncias e/ou encurtamento das hifas. Este modo de ação se aplica a diversas proteínas que possuem sítio de interação com quitina, incluindo membros da família heveína, lectinas de leguminosas e do floema de espécies de Cucurbitaceae, vicilinas, dentre outras (THEIS; STAHL, 2004; CHEN *et al.*, 2018).

Figura 3 - Esquema estrutural da quitina e da parede celular dos fungos. A: Estrutura da quitina, um homopolissacarídeo da parede celular dos fungos. Cadeia linear formada por monômeros de N-acetil-D-glucosamina com ligações glicosídicas β -(1,4). B: Representação da parede celular dos fungos. A rede tridimensional é composta internamente por microfibrilas de quitina ligadas covalentemente à glucanas. Estas, juntamente com manoproteínas, formam a camada mais externa da parede celular.



Fonte: elaborada pelo autor.

As quitinases e β -1,3-glucanases estão entre as proteínas antifúngicas que têm se destacado no contexto da engenharia genética vegetal visando à geração de culturas transgênicas resistentes. Quitinases e β -1,3-glucanases são enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de quitina e β -1,3-glucanas, respectivamente. Em geral, o efeito antifúngico destas enzimas está associado à hidrólise dos açúcares componentes da parede celular, provocando desestabilidade estrutural e lise. Entretanto, no caso de certas quitinases, o mecanismo pelo qual estas proteínas inibem o crescimento fúngico não está diretamente

relacionado à sua atividade catalítica (YAN *et al.*, 2015).

Garcia-Casado *et al.* (1998) avaliaram a atividade da quitinase da classe I isolada da semente de *Castanea sativa* contra o fungo *Trichoderma viride*. No referido estudo, uma forma mutante sem atividade quitinolítica foi gerada através de mutagênese sítio dirigida. Os autores observaram que a quitinase mutante foi capaz de inibir o crescimento do fungo tanto quanto a quitinase tipo-selvagem, sugerindo que a catálise não é necessária para a atividade antifúngica destas formas variantes. Neste contexto, Iseli *et al.* (1993) também verificaram que uma forma da quitinase de tabaco contendo o sítio ligante à quitina apresentou atividade antifúngica três vezes mais efetiva quando comparada à forma na qual este domínio estava ausente. Estes estudos sugerem que a atividade antifúngica das quitinases pode estar relacionada, em maior proporção, à presença do domínio ligante à quitina. Além daqueles citados anteriormente, outro efeito também de grande importância é que a atividade catalítica das quitinases sobre a quitina presente na parede celular de fungos gera elicitores que podem ativar respostas imunes, inatas do vegetal. Estes elicitores exógenos induzem a expressão de genes vegetais de defesa, que detêm o estabelecimento da doença (WINKLER *et al.*, 2017).

Como mencionado acima, as sementes vegetais são ricas em peptídeos e polipeptídeos fungitóxicos com diferentes modos de ação. Nas seções seguintes (2.3 e 2.4), são abordados aspectos da estrutura e biossíntese que estão na base da classificação de duas importantes famílias de proteínas antifúngicas: albuminas 2S e proteínas ligantes à quitina.

2.3 Proteínas da família albumina 2S: estrutura e biossíntese

A estrutura compacta de uma albumina 2S usualmente consiste de cinco α -hélices estabilizadas por quatro pontes dissulfeto. Estas pontes envolvem oito resíduos de cisteína em posições conservadas (8CM). O motivo cisteínico das albuminas 2S consiste em dois resíduos de cisteína (C_1 e C_2) localizados na subunidade menor e os seis restantes na subunidade maior, com C_3 e C_4 consecutivos e C_5 e C_6 separados por apenas um aminoácido. As subunidades são ligadas por duas pontes dissulfeto formadas entre os resíduos C_1 - C_5 e C_2 - C_3 . Os resíduos C_4 - C_7 e C_6 - C_8 , por sua vez, formam duas pontes dissulfeto intra-cadeia na subunidade menor (Figura 4A). O esqueleto de cisteínas confere rigidez e estabilidade às albuminas 2S mediante variações de temperatura e pH, sendo compartilhado com outros membros da superfamília prolamina, como LTPs e inibidores de α -amilase/tripsina (TOMAR *et al.*, 2014 a) (Fig. 4B).

As albuminas 2S são sintetizadas como uma única cadeia polipeptídica precursora de Mr~18-21 kDa. Seu acesso à via secretora do sistema de endomembranas é estabelecido

por sua sequência sinal. Após remoção do peptídeo sinal, a proteína precursora assume sua conformação dobrada no lúmen do retículo endoplasmático, que também é o sítio de formação das pontes dissulfeto. A proteína precursora é, então, transportada ao vacúolo de reserva. Neste último compartimento, ocorre a remoção de sequências curtas da região N e C-terminal e do peptídeo *linker*, resultando na proteína madura, com uma subunidade menor de Mr~3-4 kDa e outra maior de Mr~8-10 kDa. Este modelo de biossíntese e processamento é baseado na albumina 2S de *B. rapa*, denominada napina. Similar processamento também foi descrito para as albuminas 2S de *Lupinus angustifolius* (conglutina δ), *Ricinus communis* e *Gossypium hirsutum*, dentre outras proteínas heterodiméricas semelhantes à napina. Por outro lado, variações neste padrão também ocorrem, como é o caso das albuminas 2S do girassol (*Helianthus annuus*), cujas formas precursoras não são clivadas e, por esta razão, as proteínas maduras são de cadeia simples (SHEWRY *et al.*, 1995) (Figura 4B).

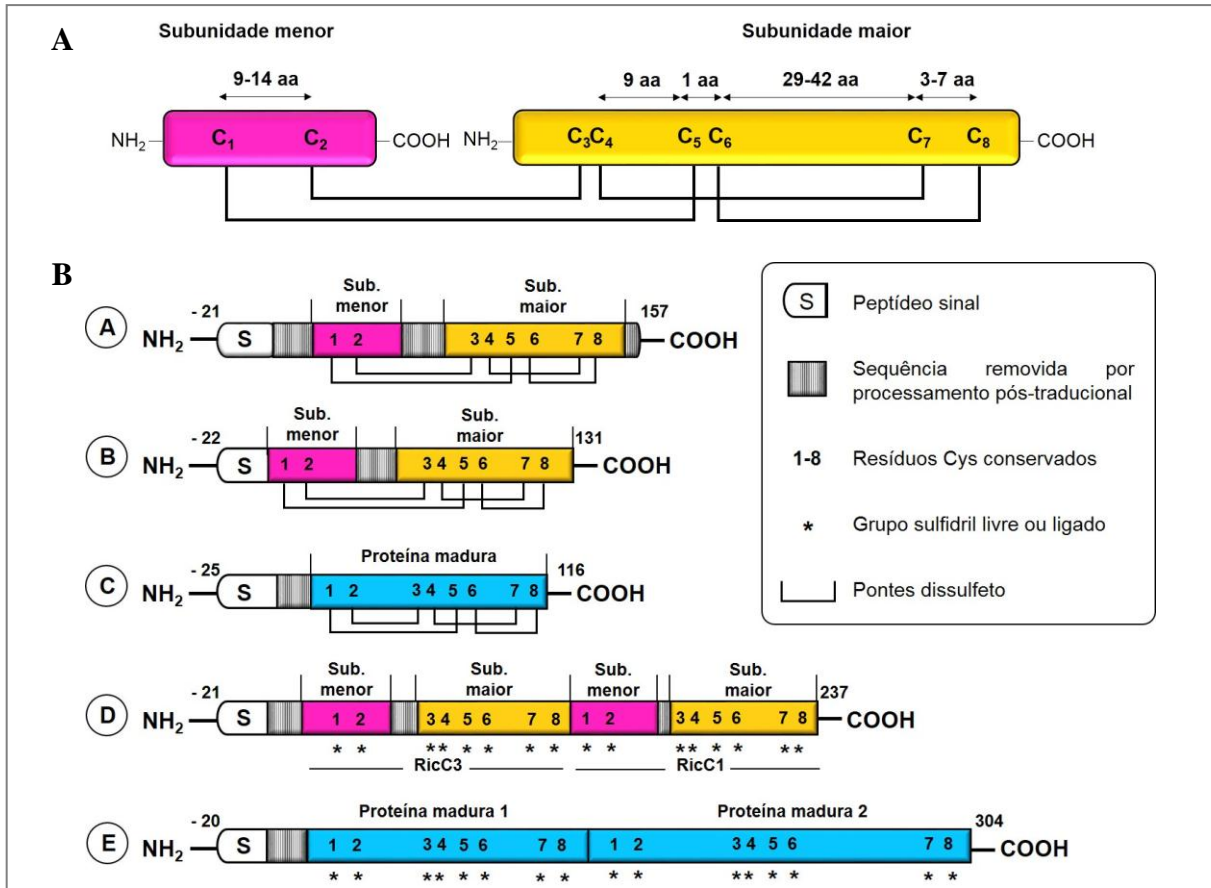
Embora a função primordial das albuminas 2S seja reserva de nutrientes, estas proteínas são multifuncionais, podendo apresentar atividade antibacteriana, antifúngica, inibitória de proteases, RNásica, DNásica e anticancerígena (FANG *et al.*, 2010; MARIA-NETO *et al.*, 2011; TOMAR *et al.*, 2014 b; COSTA *et al.*, 2015).

2.4 Proteínas ligantes à quitina: classificação e estrutura

As plantas sintetizam uma variedade de proteínas capazes de se ligar especificamente a monômeros, oligômeros e/ou polímeros de GlcNac, especialmente quitina. Quitinases e lectinas são as proteínas ligantes à quitina mais conhecidas na literatura científica, cuja diversidade estrutural e mecanismos de catálise estão na base de classificações convencionais (SULZENBACHER *et al.*, 2015).

As quitinases pertencem às famílias de glicosil hidrolases GH 18 (classes III e V) e GH 19 (classes I, II, IV e VI). Ambas as famílias também incluem proteínas conhecidas como tipo-quitinase, cujas sequências e estruturas possuem alto grau de similaridade com quitinases tradicionais, porém diferindo destas últimas por serem cataliticamente inativas. O mecanismo enzimático clássico das quitinases envolve um resíduo de glutamato. Por diferentes processos evolutivos, as proteínas tipo-quitinases perderam o potencial catalítico do seu resíduo glutamato. No entanto, a habilidade de ligação à quitina das proteínas tipo-quitinase permaneceu intacta, sendo de extrema importância para manutenção da atividade antifúngica (KESARI *et al.*, 2015).

Figura 4 - Estruturas esquemáticas de formas típicas e variantes das albuminas 2S de plantas. A: Esquema geral de uma albumina 2S madura. O motivo cisteínico possui oito resíduos de cisteína (C1-8) em posições conservadas, formando duas pontes que ligam as subunidades e duas pontes intra-cadeia na subunidade maior. B: Esquema de albuminas 2S precursoras de *B. rapa* (A); *L. angustifolius* (B); *H. annuus* (C/E) e *R. communis* (D). As formas precursoras da napina (A) e conglutina δ (B) são processadas em suas respectivas proteínas maduras heterodiméricas. As albuminas 2S de *H. annuus* são sintetizadas como uma (C) ou duas (E) proteínas maduras codificadas por um único RNAm. As albuminas 2S de *R. communis*, também codificadas por um único RNAm, são processadas em duas proteínas maduras heterodiméricas, cada uma formada por duas subunidades.



Fonte: elaborada pelo autor, adaptada de Shewry *et al.* (1995).

As lectinas, por definição, possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a carboidrato (CBD). Dependendo do número de CBDs, as lectinas são classificadas como merolectinas (um CBD), hololectinas (dois ou mais CBDs com afinidade por um mesmo tipo de açúcar), quimerolectinas (um CBD e um domínio não-relacionado) ou superlectinas (dois ou mais CBDs com afinidade por açúcares diferentes). Ao contrário das hololectinas, conhecidas pela capacidade de precipitar gliconjugados ou aglutinar células, as hololectinas são desprovidas de tais atividades. No caso das lectinas ligantes à quitina, embora possam interagir com GlcNac, a maioria delas se liga, preferencialmente, à cadeia de quitina (DAMME *et al.*, 1998).

Peptídeos e proteínas da família heveína apresentam um domínio ligante à quitina similar ao domínio presente na heveína, uma lectina isolada do látex de *Hevea brasiliensis*. O domínio heveínico consiste em uma sequência de 43 aminoácidos, contendo um resíduo serina e três resíduos aromáticos em posições conservadas, bem como seis a oito resíduos cisteína envolvidos na formação de pontes dissulfeto intramoleculares. Os resíduos aromáticos deste sítio são cruciais para ligação à quitina (THEIS; STAHL, 2004). Diversos peptídeos e proteínas com domínio heveínico foram isolados de sementes (*Triticum vulgare*, *Amaranthus caudatus*), frutos (*Solanum lycopersicum*), rizomas (*Urtica dioica*), tubérculos (*Solanum tuberosum*) e folhas (*Sambucus nigra*) (ITAKURA *et al.*, 2017).

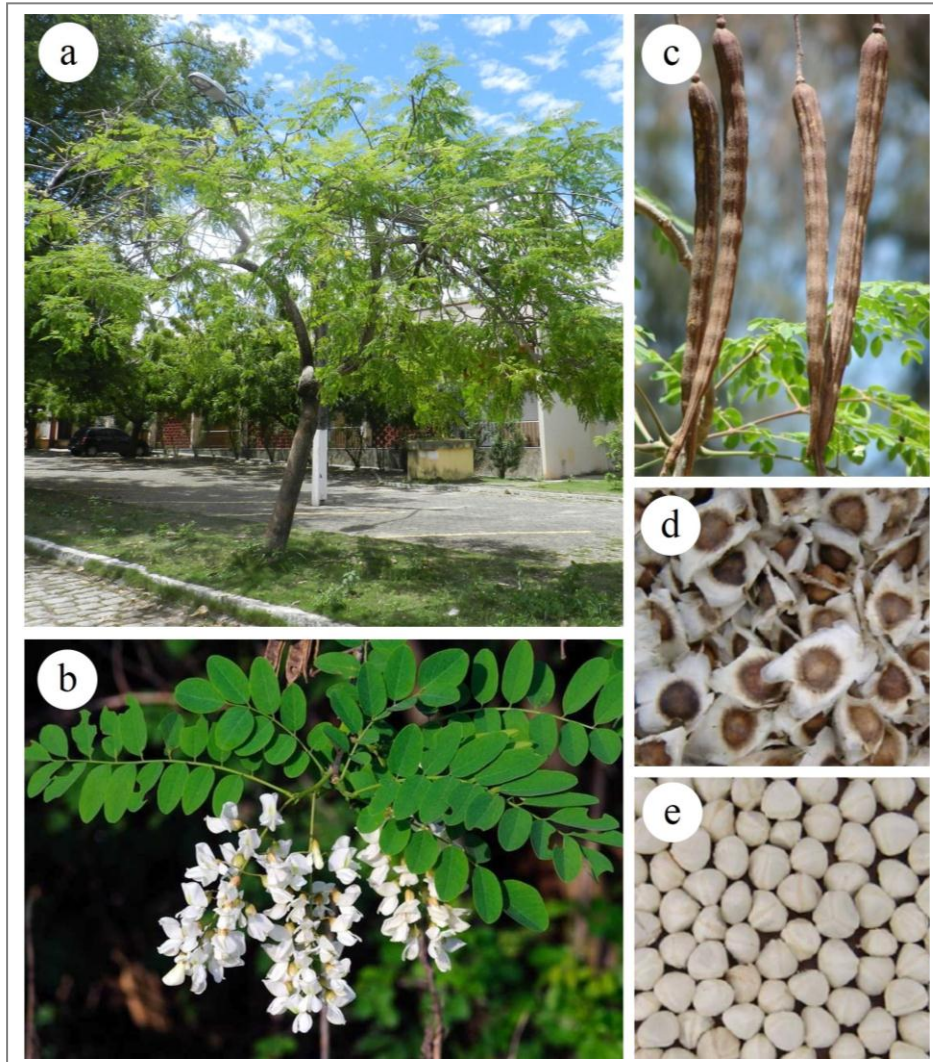
Proteínas ligantes à quitina também são categorizadas na família PR-4, sendo subdivididas em duas classes. As proteínas da classe I possuem um domínio ligante à quitina na região N-terminal similar ao domínio presente na heveína. Proteínas da classe II, por sua vez, são desprovidas de domínio heveínico (FERREIRA *et al.*, 2007).

Os sistemas de classificação para proteínas ligantes à quitina isoladas de sementes, mencionados acima, não são absolutos, já que um mesmo tipo de proteína pode oscilar entre um ou mais grupos dependendo da sua estrutura e função. Por fim, estudos moleculares e filogenéticos mostram uma ancestralidade comum entre os domínios ligantes à quitina, principalmente de lectinas e quitinases (KESARI *et al.*, 2015).

2.5 Sementes de *Moringa oleifera*: fonte de CBPs antifúngicas

Moringa oleifera Lamarck é uma planta nativa da Índia, amplamente cultivada nos trópicos e bem adaptada às condições edafoclimáticas da região nordeste do Brasil. *M. oleifera* é encontrada nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará, sendo conhecida popularmente como “lírio branco”, “quiabo-de-quina” e “moringa” (PANDEY *et al.*, 2011). Esta espécie é a mais importante da família Moringaceae (Brassicales) por seu valor medicinal, ornamental, forrageiro, melífero, nutricional, dentre outros (SINGH *et al.*, 2013). Apresenta porte arbóreo, frutos do tipo vagem e sementes aladas com dispersão do tipo anemófila (Figura 5).

Figura 5 – Hábito, partes vegetativas e reprodutivas de *Moringa oleifera* Lam. A: hábito arbóreo; B: folhas compostas pinadas e flores em panícula; C: frutos do tipo vagem maduros; D: sementes aladas maduras; E: sementes destegumentadas.



Fonte: elaborada pelo autor.

As sementes também são ricas em lipídeos e proteínas, destacando-se como um recurso potencial para produção de biodiesel. As sementes de moringa são comumente utilizadas na purificação de água, atuando como um coagulante natural de partículas e microrganismos em suspensão (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). A propriedade coagulante foi inicialmente atribuída a proteínas de natureza básica. Posteriormente, uma proteína ácida também foi caracterizada como um componente coagulante da semente de moringa. A maioria destas proteínas corresponde a lectinas típicas com atividade hemaglutinante (SANTOS *et al.*, 2005; KATRE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2013).

O extrato das sementes de moringa possui atividade contra bactérias de interesse

clínico (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*), leveduras (*Candida albicans*), dermatófitos (*Trichophyton sp.*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*) e fungos fitopatogênicos (*Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*). Os componentes possivelmente envolvidos nestas atividades incluem saponinas, taninos, isotiocianatos, compostos fenólicos (especialmente alcalóides e flavonóides), peptídeos e proteínas (DONLI; DAUDA, 2003; SHEBEK *et al.*, 2015; BRILHANTE *et al.*, 2017; KINI *et al.*, 2017).

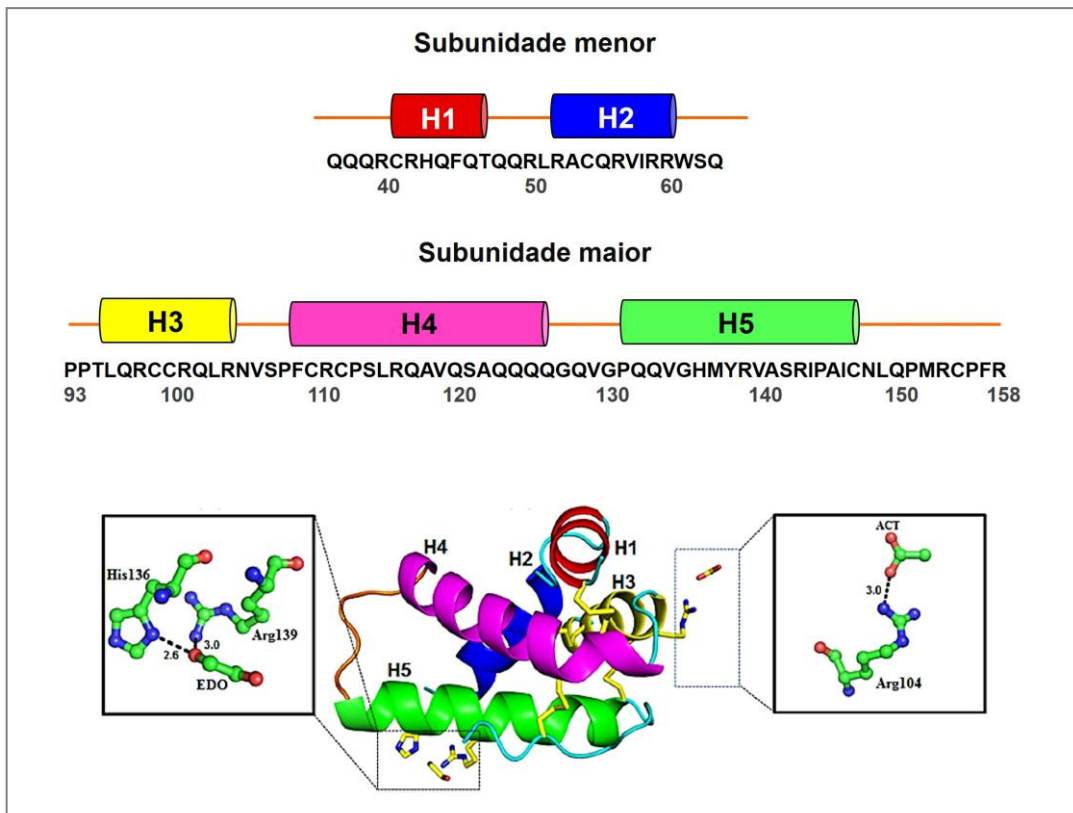
Nas duas últimas décadas, diversas proteínas, de moringa com diferentes propriedades biológicas foram estudadas: peroxidases isoladas de calos (SHANK *et al.*, 2013), inibidor de proteases serínicas (BIJINA *et al.*, 2011) e peptídeos tipo-heveína (KINI *et al.*, 2017) isolados das folhas, além de, proteína catiônica antibacteriana (SHEBEK *et al.*, 2015), proteínas ligantes à quitina com atividade antifúngica (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012; NETO *et al.*, 2017) e lectinas com atividade antibacteriana (FERREIRA *et al.*, 2011), inseticida (OLIVEIRA *et al.*, 2011), larvicida (AGRA-NETO *et al.*, 2014) e nematocida (MEDEIROS *et al.*, 2018) isoladas das sementes.

Proteínas ligantes à quitina foram identificadas, pela primeira vez em moringa, no extrato aquoso das sementes (GOMES, 2002). Posteriormente, as frações contendo estas proteínas foram testadas quanto à capacidade de inibir a germinação de esporos fúngicos, mostrando atividade contra *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. lindemuthianum* e *F. solani* (GIFONI, 2009). Tais proteínas, também denominadas *Mo*-CBPs (*Moringa oleifera* chitin-binding proteins), foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade em matriz de quitina na primeira etapa, seguida por cromatografia de troca iônica. As proteínas adsorvidas na resina trocadora de cátions foram eluídas com NaCl em diferentes concentrações (0,4; 0,5 e 0,6 M), obtendo-se, assim, as isoformas *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃ e *Mo*-CBP₄, respectivamente.

As *Mo*-CBPs são glicoproteínas básicas (pI 10,5 a 10,9) constituídas por uma cadeia menor (3,8 a 4,6 kDa) e outra maior (7,9 a 8,4 kDa) ligadas por pontes dissulfeto (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012; NETO *et al.*, 2017). A constatação de atividade antifúngica das *Mo*-CBPs foi realizada em estudos independentes, sendo relatada uma potente atividade anticandida (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) para *Mo*-CBP₂, um amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos (*F. solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloesporioides*) para *Mo*-CBP₃ e atividade antidermatofítica (*Trichophyton mentagrophytes*) para *Mo*-CBP₄. Estes estudos indicaram que as *Mo*-CBPs apresentam, em parte, modos de ação similares, aumentando a permeabilização da membrana

plasmática e produção de espécies reativas de oxigênio (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2014; NETO *et al.* 2017). As *Mo*-CBPs são desprovidas de atividade hemaglutinante, quitinásica e β -1,3 glucanásica (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012; NETO *et al.* 2017). De acordo com a classificação proposta por Damme e colaboradores (1998), estas proteínas podem ser categorizadas como merolectinas, uma vez que possuem apenas um domínio ligante à quitina. A sequência de aminoácidos e a estrutura secundária da *Mo*-CBP₃, obtidas a partir de estudos de clonagem e cristalografia, mostraram que esta proteína se trata de uma típica albumina 2S (FREIRE *et al.*, 2015; ULLAH *et al.*, 2015) (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Representação estrutural da isoforma *Mo*-CBP₃-1, com base na estrutura cristalográfica. A estrutura secundária de *Mo*-CBP₃-1 é caracterizada por 5 α -hélices (H1-H5) estabilizadas por pontes dissulfeto (bastões em amarelo). H1 e H2 representam a subunidade menor (cadeia leve) e H3-H5 a subunidade maior (cadeia pesada).



Fonte: elaborada pelo autor, adaptado de Ullah *et al.* (2015).

Figura 7 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da isoforma *Mo*-CBP₃₋₃ e de albuminas 2S de plantas. As seqüências deduzidas das subunidades menor e maior de *Mo*-CBP₃₋₃ estão representadas em **A** e **B**, respectivamente. Mabinlin-II (*C. masaikai*), Sesa1 (*A. thaliana*), Napin-2 (*B. napus*), Sin a 1 (*S. alba*), Napin-1 a (*B. napus*), Ric c 3 (*R. communis*), Ber e 1 (*B. excelsa*), Ric c 1 (*R. communis*), and Gm2S-1 (*G. max*). Resíduos Cys conservados e sítios contendo resíduos com propriedades similares estão destacados em cinza.

A	MoCPB ₃₋₃	QQQCRCQQFLTHQRLLRACQRFIRRQTQGGGALE	73
	Mabinlin-II	QLWRCQRQFLQHQRLLRACQRFIHRRAQFGGQPD	68
	Sesa1	KMRKCRKEFQKEQHLLRACQQLMLQARQGRSD	73
	Napin-2	RIPKCRKEFQQAQHLLRACQQLWHLKQAMQSGGG	74
	Sin a 1	RIPKCRKEFQQAQHLLRACQQLWHLKQAMQSGSGPS	39
	Napin-1 a	QPQKCRQEFQEQHLLRACQQWIRQLLAGSPF	31
	Ric c 3	SSQQCRQEVQRKD - LSSCERYLRQSSRRSPGE	76
	Ber e 1	QEECREQMQRQQMLSHCRMVMRQQMEES	64
	Ric c 1	SQQGCRGQIQEQQLNLRQCQEYIKQVSGQGP RR	190
	Gm2S-1	QQDSCRKQLQGVN - LTPCEKHIMEKIQGRGDDDD	64
	B	MoCPB ₃₋₃	RPAIQRCCQQLRNI - QPRCRCPSLRQAVQLAHQQ
Mabinlin-II		QPRR PALRQCCNQLRQV - DRPCVCPVLRQAAQVQLOR	118
Sesa1		GQQEQQLFQCCNELRQE - EPDCVCP TLKQAAKAVL	122
Napin-2		PQQRPLLQCCNELHQE - EPLCVCPTLKGASKAVKQIQQQ	135
Sin a 1		GPQQRPLLQCCNELHQE - EPLCVCPTLKGASKAVKQVVRQQ	98
Napin-1 a		GPQEGPWLRQCCNELYQE - DQVCVCP TLKQAAKSVRV	70
Ric c 3		QQESQQLQCCNQVKQV - RDECQCEAIKYIAEDQIQ	122
Ber e 1		PRRGMEPHMSECCQLEGM - DESCRCEGLRMMMMRQQE	107
Ric c 1		QERSLRGCCDHLKQM - QSQCRCGLRQAIEQQQS	226
Gm2S-1		EDEEEEGHMQKCCTEMS ELRSPKCQCKALQKIMENQSEE	43
MoCPB ₃₋₃		QFQVGPQQVRQMYRLASNIPAI CNLRPM - SCPFGQQ	160
Mabinlin-II		QIQGPQQLRRLFDAARNLPNICNIPNIGACP FRAW	154
Sesa1		QQQHQPQVRKIYQTAKHLPNVCDIPQVDVCPFNIPSFPS	162
Napin-2		QQMVSRIYQTATHLPKVCNIPQVSVC PFQKTMPG	175
Sin a 1		QQPHLQHVISR IYQTATHLPKVCNIRQVSVC PFKKTMPGPS	145
Napin-1 a		QQQHGPFFSTR IYQIAKNLPNV CNMKQIGTCPFIAIPFFP	110
Ric c 3		QQQLHGEESEVAQRAGEIVSSCGVR - - - CMRQT	153
Ber e 1		EMQPRGEQMRMRLAENIPSR CNLSPM - RCPMGGS	142
Ric c 1		QQQLQGQDVFEAFRTAANLP SMCVGSPT - ECRF	258
Gm2S-1		LEEKQKKMEKELINLA TMC RFGPMIQCDLSSDD	77

Fonte: elaborada pelo autor, adaptado de Freire *et al.* (2015).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos dos peptídeos trípticos de *Mo*-CBP₂ e *Mo*-CBP₄ também mostrou alto grau de similaridade com albuminas 2S vegetais (NETO *et al.*, 2017). Somando estes resultados ao fato de que as *Mo*-CBPs foram obtidas, com alto rendimento, a partir do fracionamento de albuminas no processo de purificação, torna-se plausível considerá-las como SSPs, integrando um grupo particular de albuminas 2S com habilidade de se ligar à quitina. Tendo em conta que as albuminas são codificadas por uma família multigênica, que geram diversas isoformas, pode-se presumir que as *Mo*-CBPs existem, também, como uma mistura de isoformas nas sementes de moringa, apresentando um extraordinário espectro de ação contra fungos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o padrão de expressão gênica, localização espaço-temporal e atividade antifúngica de proteínas ligantes à quitina (*Mo*-CBPs), durante o desenvolvimento e germinação da semente de *Moringa oleifera*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar histologicamente o desenvolvimento da semente de *M. oleifera* contemplando seus tecidos de reserva proteica;
- Conhecer o padrão de expressão gênica, por meio dos transcritos das *Mo*-CBPs, ao longo do desenvolvimento da semente;
- Conhecer o perfil de acumulação das *Mo*-CBPs, avaliando seus teores e distribuição nos tecidos em diferentes estágios do desenvolvimento da semente;
- Determinar o perfil de degradação das *Mo*-CBPs nos tecidos da semente durante seu processo germinativo;
- Avaliar o efeito das *Mo*-CBPs, isoladas em diferentes estágios de desenvolvimento da semente, sobre a germinação de esporos de três espécies de *Fusarium*, como modelos de fungos fitopatogênicos de relevância na agricultura.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Revista científica

O artigo científico referente à tese foi publicado no Periódico Internacional de Biologia Vegetal “Planta” (Online ISSN: 1432-2048).

Título

Gene expression and spatio-temporal localization of antifungal chitin-binding proteins during *Moringa oleifera* seed development and germination.

DOI

<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03103-8>

Autoria

Tarcymara B. Garcia¹, Arlete A. Soares², Jose H. Costa¹, Helen P. S. Costa¹, João X. S. Neto¹, Lady Clarissa B. Rocha-Bezerra¹, Fredy Davi A. Silva¹, Mariana R. Arantes¹, Daniele O. B. Sousa¹, Ilka M. Vasconcelos¹, Jose T. A. Oliveira¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceara, Fortaleza 60440-900, CE, Brazil.

² Department of Biology, Federal University of Ceara, Fortaleza 60440-900, CE, Brazil.

Ilka M. Vasconcelos: imvasco@ufc.br, Jose T. A. Oliveira: jtaolive@ufc.br, Tarcymara B. Garcia: tarcymara@gmail.com, Arlete A. Soares: arlete@ufc.br, Jose H. Costa: costajhe@yahoo.com.br, Helen P. S. Costa: heloscosta@gmail.com, João X. S. Neto: xavierbio1@hotmail.com, Lady Clarissa B. Rocha-Bezerra: puellady@gmail.com, Fredy Davi A. Silva: fredydavi@hotmail.com, Mariana R. Arantes: marianareisarantes@hotmail.com, Daniele O. B. Sousa: daniele.sousa@ufc.br

Abstract

Main conclusion: Chitin-binding proteins behave as storage and antifungal proteins in the seeds of *Moringa oleifera*.

Moringa oleifera is a tropical multipurpose tree. Its seed constituents possess coagulant, bactericidal, fungicidal, and insecticidal properties. Some of these properties are attributed to a group of polypeptides denominated *M. oleifera* chitin-binding proteins (in short, *Mo*-CBPs). Within this group, *Mo*-CBP2, *Mo*-CBP3, and *Mo*-CBP4 were previously purified to homogeneity. They showed high amino acid similarity with the 2S albumin storage proteins. These proteins also presented antimicrobial activity against human pathogenic yeast and phytopathogenic fungi. In the present study, the localization and expression of genes that encode *Mo*-CBPs and the biosynthesis and degradation of the corresponding proteins during morphogenesis and maturation of *M. oleifera* seeds at 15, 30, 60, and 90 days after anthesis (DAA) and germination, respectively, were assessed. The *Mo*-CBP transcripts and corresponding proteins were not detected at 15 and 30 days after anthesis (DAA). However, they accumulated at the latter stages of seed maturation (60 and 90 DAA), reaching the maximum level at 60 DAA. The degradation kinetics of *Mo*-CBPs during seed germination by in situ immunolocalization revealed a reduction in the protein content 48 h after sowing (HAS). Moreover, *Mo*-CBPs isolated from seeds at 60 and 90 DAA prevented the spore germination of *Fusarium* spp. Taken together, these results suggest that *Mo*-CBPs play a dual role as storage and defense proteins in the seeds of *M. oleifera*.

Keywords: Drumstick seed. *Mo*-CBPs. 2S albumin. Biosynthesis. Degradation. Antifungal activity

4.1 Introduction

M. oleifera Lam. (Moringaceae, Brassicales), known as Ben oil, miracle, horseradish, drumstick or moringa tree, is a multipurpose plant native from India and widely cultivated in subtropical and tropical regions (Pandey et al. 2011). It has nutritional importance as most of its portion is edible (Leone et al. 2015). Besides it has flocculating capacity (Keogh et al. 2017) and pharmacological uses (Brilhante et al. 2017). The *M. oleifera* seeds contain flocculating proteins that have been used to clarify drinking water (Pavankumar et al. 2014) and to treat dyeing effluents (Ali and El-Mohamedy 2016). In addition, antifungal (Chuang et al. 2007), analgesic (Sutar et al. 2008), anti-inflammatory (Araújo et al. 2013), antioxidant (Singh et al. 2013), antidiabetic (Al-Malki and El Rabey 2015), antitumor (Al-Asmari et al. 2015), and bactericidal (Shebek et al. 2015) activities have been attributed to different seed compounds.

Chitin-binding proteins (CBPs) are molecules usually related to plant defense. They belong to the pathogenesis-related protein class of the PR-4 family and show antifungal activity (Kim et al. 2014). Antifungal CBPs disturb the synthesis and/or deposition of chitin in the cell wall (Becker-Ritt and Carlini 2012) and thus negatively affect the fungal growth and development. Recently, three *Mo*-CBPs, named *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃ and *Mo*-CBP₄, were isolated from the mature seeds of *M. oleifera* by our research group. These three *Mo*-CBPs are highly thermostable basic glycoproteins with pIs varying from 10.5 to 10.9. They are composed of a small (3.8 to 4.6 kDa) and a large (7.9 to 8.4 kDa) polypeptide chain linked by disulfide bonds (Pereira et al. 2011; Batista et al. 2014; Neto et al. 2017).

Moreover, they have potent *in vitro* antifungal action, but are devoid of chitinase, β -1,3-glucanase, and haemagglutination activity. *Mo*-CBP₂ inhibited the growth of *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* (Neto et al. 2017). *Mo*-CBP₃ hindered the growth of the phytopathogenic fungi *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae*, and *C. gloesporioides* (Batista et al. 2014). *Mo*-CBP₄ showed antimicrobial activity against the dermatophyte fungus *Trichophyton mentagrophytes*, both *in vitro* and *in vivo* (Lopes 2016).

Mo-CBP₃ is a mixture of at least four isoforms, which differ from each other by few amino acid residues. The deduced amino acid sequence and crystal structure of these isoforms revealed that *Mo*-CBP₃ is a member of the 2S albumin family (Freire et al. 2015; Ullah et al. 2015). Comparative analyses of the tryptic peptide sequences generated from *Mo*-CBP₂ and *Mo*-CBP₄ revealed similarity with *Mo*-CBP₃ and 2S albumins from different plant

species (Pereira 2014; Lopes 2016; Neto et al. 2017). Therefore, we believe that all *Mo*-CBPs are members of the 2S albumin family encoded by a multigene family (Freire et al. 2015). Nevertheless, *Mo*-CBPs appear to have at least dual physiological roles: they may act as seed storage and defense proteins, like other 2S albumins (Maria-Neto et al. 2011).

Here we report the expression and spatio-temporal localization of the genes that encodes *Mo*-CBPs during the *M. oleifera* seed development. Initially, histological analysis of the *M. oleifera* seed during the development was performed as a guide to evaluate the expression of the genes that code for *Mo*-CBPs and localization of the corresponding proteins. In addition, the antimicrobial activity of the partially isolated *Mo*-CBPs, at each seed developmental stage, towards some phytopathogenic fungi from the *Fusarium* genus, was determined. Mobilization of *Mo*-CBPs during the seed germination was also evaluated. Altogether the obtained results indicated that the expression patterns of the genes that encoded *Mo*-CBPs are regulated during the seed development. Moreover, accumulation of the corresponding proteins in the latter seed maturation stages suggests that they contribute to nutrient allocation during the seed germination and protect the growing embryo towards fungal pathogens.

4.2 Material and methods

4.2.1 Biological materials and chemical reagents

M. oleifera seeds at different developmental stages were collected from trees at Campus do Pici of Federal University of Ceara - UFC (Fortaleza, CE, Brazil) under authorization (number: 47766) of the Chico Mendes Institute for Conservation of Biodiversity - ICMBio. A voucher specimen (EAC34591) was deposited at the Herbarium Prisco Bezerra (EAC), UFC. Developing seeds were collected at 15, 30, 60, and 90 days after anthesis (DAA). For germination, *M. oleifera* mature seeds were surface sterilized using sodium hypochlorite (2% active chloride) for 5 minutes, washed three times with distilled water (30 min each) and sown on two sheets of Germitest® paper (GERMILAB - A3034–8, 28×38 cm, neutral pH, Brazil) with eight seeds each for germination. The seeds were distributed along a line in the upper third of the sheets previously moistened with a volume of distilled water equivalent to 2.5 times the sheet dry weight, under sterile condition, leaving about 2 cm on both paper sides. The paper sheets were wrapped around themselves to form a cone (Oliveira et al. 2014) and three similar replicates were incubated in the dark in a growth chamber at 25

± 2 °C for 16 h and 20 ± 2 °C for 8 h. Germinating seeds were collected at 24, 48, 72, and 96 hours after sowing (HAS).

The filamentous fungi *F. solani* (Mart.) Sacc. (URM 787) and *F. oxysporum* Schltdl. (URM 7083) were provided by the Department of Mycology of the Federal University of Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil). *F. pallidoroseum* (Cooke) Sacc. (LF 72) was supplied by Embrapa Tropical Agroindustry at Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA, Ceara, Brazil).

Three-month-old New Zealand white male rabbits (2 kg body mass) were provided by the Zootechny Department of UFC and were used for anti-*Mo*-CBP₄ antibody production. The experimental protocol was approved by the Research Ethics Committee of UFC, Brazil (protocol number 77/2016).

Reagents for RT-PCR/qRT-PCR were purchased from Promega (Madison, WI, United States). Molecular mass markers and chromatographic matrices were obtained from GE Healthcare Life Sciences (New York, NY, USA). Paraplast Plus®, Permout and Fluoromount mounting media, phosphatase alkaline-conjugated goat anti-rabbit IgG (A-3812), fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate-goat anti-rabbit IgG (F0382), and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

4.2.2 Histological characterization

Seed samples (micropylar, medium and chalazal region) were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky 1965) and embedded into Leica historesin (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) or Paraplast Plus according to the manufacturer's instructions. Samples embedded into historesin were dehydrated with graded ethanol concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100% (v/v), for 1 h each step (Soares et al. 2014). Seed sections of 5-7 μm were stained with 0.5% (v/v) toluidine blue in 0.12% (m/v) borax followed by 0.5% (m/v) aqueous basic fuchsin (Junqueira 1990). Samples infiltrated in Paraplast Plus at 60 °C were dehydrated in a t-butyl alcohol series of 70, 85, 95, and 100% (v/v) concentration, for 24 h each step (Johansen 1940). Seed sections of 10-12 μm were deparaffinized with xylene and stained with 1% (m/v) astra blue and 1% (m/v) safranin O (Gerlach 1984). All sections were prepared in a LEICA 2065 rotatory microtome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) and subsequently mounted in Permout. All photomicrographs were taken using a Leica DM 4000B optical microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany) equipped with a Leica Application Suite X software platform.

M. oleifera seed structures were examined under scanning electron microscopy (SEM) by fixing and dehydrating of the tissues through a graded ethanol series as described above. Subsequently, samples were dried with hexamethyldisilazane and sputter coated with gold (Quorum Q150TES, Quorum Technologies Ltd., Ashford, England) for analysis on SEM (Quanta™ 450 FEG, FEI, Eindhoven, The Netherlands) operating at 20 kV. Additionally, other seed sections embedded in historesin were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 to identify proteins (Fisher 1968).

4.2.3 Gene expression analysis

4.2.3.1 RNA extraction

Total RNA of developing seeds at 15, 30, 60, and 90 DAA was individually isolated from 100 mg plant material. The NucleoSpin RNA plant kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) was used for extraction according to the manufacturer's instructions. To eliminate genomic DNA contamination, RNA samples were submitted to on-column RNase-free DNase treatment. The DNase digestion efficacy was verified using total RNA and specific primers in a PCR reaction as negative control. RNA integrity was evaluated after agarose (1.2%, m/v) gel electrophoresis. Total RNA concentration (260 nm) and purity (260 nm/280 nm and 260 nm/230 nm ratios) were determined (Sambrook et al. 1989) using an Epoch™ Microplate Spectrophotometer (Bio Tek Instruments, Winooski, USA).

4.2.3.2 Quantitative real time PCR

The first-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA in 20 µL final volume using the ImProm-II™ Reverse Transcription System following the manufacturer's protocol. To evaluate the amplicon specificity, all primer pairs were previously tested by standard PCR assays. Temperature gradient was applied to find out the best experimental annealing temperature for the primers used in PCR. The amplified PCR products were visualized after agarose (1.5%, m/v) gel-electrophoresis in the presence of ethidium bromide. A general primer pair was designed to detect the 4 gene members of the *MoCBP3* family previously identified (Freire et al., 2015). Actin, ubiquitin (UBC), alpha tubulin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes were evaluated as reference

genes to normalize expression data. The primers used are listed in Table 1.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis was performed on RealPlex 4S thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) using GoTaq® qPCR master mix. The 20 µL reaction volume contained 1 µL primer (300 ng/µL) and 4 µL cDNA (25 ng/µL). The amplification reaction consisted of an initial step at 95 °C/10 min for enzyme activation, followed by 40 denaturation cycles at 95 °C/15 s, annealing at a specific temperature for each gene (Table 1)/15 s, and extension at 60 °C/20 s. The melting curves of PCR done in triplicate were analyzed to ensure that the primers used were specific to the target of interest. Actin, UBC, and GAPDH were chosen as the best combination of stable genes to normalize gene expression by qBase^{PLUS2} (Version 2.4) software (Hellemans et al. 2007). Threshold cycle (Ct) for each sample was determined using the Eppendorf Mastercycle ep realplex 2.2 software. The relative expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using the sample with the highest Ct as calibrator (Livak and Schmittgen 2001).

Table 1. Primers used to establish the reference genes to normalize *Mo*-CBPs-associated gene expression.

GenBank		Primer sequence (5' to 3')		Tm (°C)	Amplification efficiency
Accession	Definition				
JQ081230.1	Actin (<i>M. oleifera</i>)	For	TCCTCTTCCAGCCATCACTC	57.5	0.88
		Rev	ACCACTAAGCACAATGTTACCA		
JQ764560.1	GAPDH (<i>M. oleifera</i>)	For	AGATTTGGCATTGTTGAGGG	63.6	0.97
		Rev	GGAATGATGTTGAATGAAGCAG		
JQ764563.1	UBC (<i>M. oleifera</i>)	For	ATTTCTTCATCCAGCTCCAC	63.6	0.99
		Rev	GGTCATTATCTTCAGGGCGT		
JQ764561.1	Alpha-tubulin (<i>M. oleifera</i>)	For	CACTGTCTACCCATCTCCAC	57.5	0.78
		Rev	TCAATATCAAGAGAACGCCTG		
KF616830.1	2S albumin precursor (<i>M. oleifera</i>)	For	TCACTSAGGCARGCAGTACAG	57.5	0.99
KF616831.1		Rev	AGSTGCCYVTTCSGTCAGCA		
KF616832.1					
KF616833.1					

Legend: For (Forward); Rev (Reverse)

4.2.4 *Mo*-CBPs and protein fraction preparation

Developing *M. oleifera* seeds from 15 to 90 DAA were used to prepare the albumin fraction (ALB) from which the chitin-binding protein-enriched fraction (*Mo*-CBPef), containing the chitin-binding proteins collectively abbreviated *Mo*-CBPs, which encompasses the *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄ isoforms, was obtained according to Neto et al.

(2017). Seeds were powdered in liquid nitrogen and the resulting flour was defatted with *n*-hexane (1:10, m/v) for 5 days, with 2-daily changes of solvent. The defatted flour was air-dried at room temperature (23 ± 2 °C) and stored at -20 °C until use.

To extract proteins, the defatted flour was homogenized (1:10, m/v) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.15 M NaCl under constant stirring at 4 °C for 4 hours. The suspension was filtered through a fine-screen cloth, and the filtrate was centrifuged (Himac CR32GIII refrigerated centrifuge, Hitachi, Tokyo, Japan) at 15,000 *g* at 4 °C for 30 minutes. The precipitate was discarded, the supernatant was exhaustively dialyzed (cut-off 12 kDa) against distilled water (1:40 v/v, sample/water), for 48 h, with 6-daily changes of water. The insoluble material was removed by centrifugation under the same conditions. The supernatant containing the albumin fraction (ALB) was recovered and loaded (5 mg) on a chitin column (0.5 cm x 4 cm) previously equilibrated with the above buffer. After complete removal of the non-retained proteins (NRP) with the equilibration buffer, *Mo*-CBPef was eluted with 0.05 M acetic acid. Next *Mo*-CBPef was dialyzed (cut-off 12 kDa) against distilled water (1:100 v/v, sample/water), for 24 h, at 4 °C, with 6 changes of water.

The isoforms *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄ were obtained from the dialyzed *Mo*-CBPef as previously reported (Neto et al. 2017). Briefly, *Mo*-CBPef (400 mg) was dissolved in 20 mL 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.2, and loaded on a CM-Sepharose™ Fast Flow column (2.5 cm x 20 cm) previously equilibrated with the above buffer. *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄ were recovered from *Mo*-CBPef by elution, respectively, with 0.4 M, 0.5 M, and 0.6 M NaCl included in the equilibrium buffer. Absorbance readings were taken at 280 nm to detect the eluted proteins. The obtained protein fraction was individually dialyzed (cut-off 12 kDa) against distilled water (1:40 v/v, sample/water) for 48 h at 4 °C, with 6 changes of water per day, and lyophilized for posterior analyses.

Protein concentration was determined (Bradford 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard protein. The electrophoretic profiles of *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄ were revealed with 0.1% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 after SDS-PAGE (Laemmli 1970) in 12.5% (m/v) polyacrylamide gel (10 cm × 8 cm). Protein samples (15 µg) were prepared in 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 1% (m/v) SDS and loaded to the gel submitted to 20 mA constant current and 200 volts.

4.2.5 Cross-reactivity of the polyclonal antibodies raised against Mo-CBP4 with Mo-CBP2, Mo-CBP3, and Mo-CBP4

To produce the polyclonal antibodies to test against the isoforms of *Mo*-CBPs, two rabbits were immunized subcutaneously (Rios et al. 1996) with the isoform *Mo*-CBP₄. After collection of the preimmune serum, the animals received an initial injection of 250 µg *Mo*-CBP₄ emulsified with Freund's complete adjuvant and subsequently three booster injections of 250 µg *Mo*-CBP₄ emulsified in Freund's incomplete adjuvant, at days 21, 31, and 41. Blood samples were collected at 7-10 days after each immunization. IgGs anti-*Mo*-CBP₄ were purified by saturation to 33% (m/v) with ammonium sulfate followed by affinity chromatography on a Protein A-agarose P2545 column pre-equilibrated with 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 0.15 M NaCl. Bound IgGs were eluted with 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 3.0, containing 0.1 M citric acid (Harboe and Ingild 1973). The purified anti-*Mo*-CBP₄ polyclonal antibodies were kept at -20 °C until used for ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and immunohistochemistry analysis.

Cross-reactivity of anti-*Mo*-CBP₄ with *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄ was assessed using the Ouchterlony double immunodiffusion technique (Ouchterlony and Nilsson 1986). In brief, a 1% (m/v) agarose solution in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, was solidified into Petri dishes. Wells (4.0 mm in diameter) were punched out in the gel by means of a puncher. An aliquot of 40 µL (2 mg/mL) of the anti-*Mo*-CBP₄ polyclonal antibodies or test antigen was added to the wells. Incubation was done in a humidified chamber for 24 h at 4 °C. The gel was photographed using a digital camera (Sony, MCV-CD350 model, 14.2 megapixels).

4.2.6 Assessment of Mo-CBPs by ELISA

ELISA was employed (Vasconcelos et al. 2008) to measure the content of *Mo*-CBPs in ALB and *Mo*-CBP_{ef} obtained from seeds collected from 15 to 90 DAA. Flat bottom 96-well polystyrene plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Agawam, USA) were coated with 100 µL/well of the assayed sample (10 to 20 µg/mL protein) in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6, overnight, at 4 °C. The wells were washed three times with PBST [PBS - phosphate buffered saline (0.1 M sodium phosphate, 0.01 M potassium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) containing 0.05% (v/v) Tween-20] and blocked with 200 µL 5% (m/v) skimmed milk in PBST for 8 h at 4 °C to prevent nonspecific binding. After washing four times with PBST, 100 µL of

the pre-immune or anti-*Mo*-CBP₄ polyclonal rabbit antibodies (1:8000 dilution in PBS containing 1% [v/v] skimmed milk) were added to the wells and the plate was incubated overnight at 4 °C. After washing thrice with PBST, 100 µL of the alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000 dilution in PBS containing 1% [v/v] skimmed milk) were added to the wells and incubated at 37 °C for 2 hours. Next, the wells were washed three times with PBST, 100 µL of *p*-nitrophenyl phosphate (substrate, 1 mg/mL⁻¹) in 0.1 M glycine buffer, pH 10.4, were added and the plate was incubated at 37 °C for 30 min in the dark. The reaction was stopped by addition of 100 µL of 4 M NaOH and the absorbance was measured at 405 nm (Epoch™ Microplate spectrophotometer, Bio Tek Instruments, Winooski, USA). A standard curve was obtained using known concentrations of the purified *Mo*-CBP₄ as antigen.

4.2.7 In situ localization of Mo-CBPs

Immunolocalization assay was performed in fresh seeds (from 15 to 90 DAA) as previously described (Krügel et al. 2008). Seeds were hand-cut with a razor blade and the sections were blocked with PBST containing 3% (m/v) skimmed milk, at 37 °C, for 2 hours. After washing three times with PBST, the sections were incubated with anti-*Mo*-CBP₄ polyclonal antibodies (1:200 dilution in PBS containing 1% [m/v] skimmed milk) overnight, at 4 °C. Subsequently, the sections were washed three times with PBST and incubated with goat anti-rabbit IgG-FITC conjugated (1:80 dilution in PBS containing 1% [m/v] skimmed milk) at 37 °C for 2 h, in the dark. After washing thrice with PBST, the sections were mounted with Fluoromount medium, covered with a coverslip and analyzed under a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope (CLSM) (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Negative controls were similarly prepared, except that the primary antibody was omitted.

To verify the *Mo*-CBPs' mobilization during seed germination, a preliminary immunolocalization assay was performed in seeds collected at 24, 48, 72, and 96 HAS. Next, the fresh seeds were hand-cut with a razor blade and prepared for confocal laser scanning microscopy as described above.

4.2.8 Antifungal activity

The ability of ALB and *Mo*-CBP_{ef} isolated from the seeds of *M. oleifera* collected from 15 to 90 DAA, and of *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄ to inhibit spore germination was assayed (Ji and Kúć 1996) against the filamentous fungi *F. solani*, *F. oxysporum*, and *F.*

pallidoroseum. The fungi were grown for 12 days at 30 °C in Petri dishes containing potato dextrose agar. The spore suspension was obtained from each fungal species by gently rinsing the surface of sporulated cultures with sterile distilled water (5 mL) and with a triangular Drigalski rod. Spore suspensions were filtered through cheesecloth and concentration adjusted to 2×10^5 conidia/mL, using a Neubauer chamber. The spore suspension (10 μ L) was incubated in reticulated plates with the same volume of the tested protein samples (0.1 mg protein/mL final concentration) for 24 h at 30 °C. In the inhibitory (positive) and non-inhibitory (negative) controls, spores were incubated with 0.1 M H₂O₂ and sterile distilled water, respectively. Inhibitory effect of the studied proteins, in relation to the negative and positive controls, was assessed using an optical microscope (Olympus BX-60, Tokyo, Japan) by counting the number of ungerminated spores amongst 50 cells randomly selected from each treatment. Results are expressed in percentage from experiments performed in triplicate. Photomicrographs were taken using a digital camera (Sony, MCV-CD350 model, 14.2 megapixels) coupled to the microscope.

4.2.9 Statistical analysis

Data were obtained from six independent experiments. The results are expressed as the mean \pm standard deviation. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, San Diego, USA). Data were analyzed by ANOVA and the mean differences were compared by Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$).

4.3 Results

4.3.1 Histology of developing *M. oleifera* seed

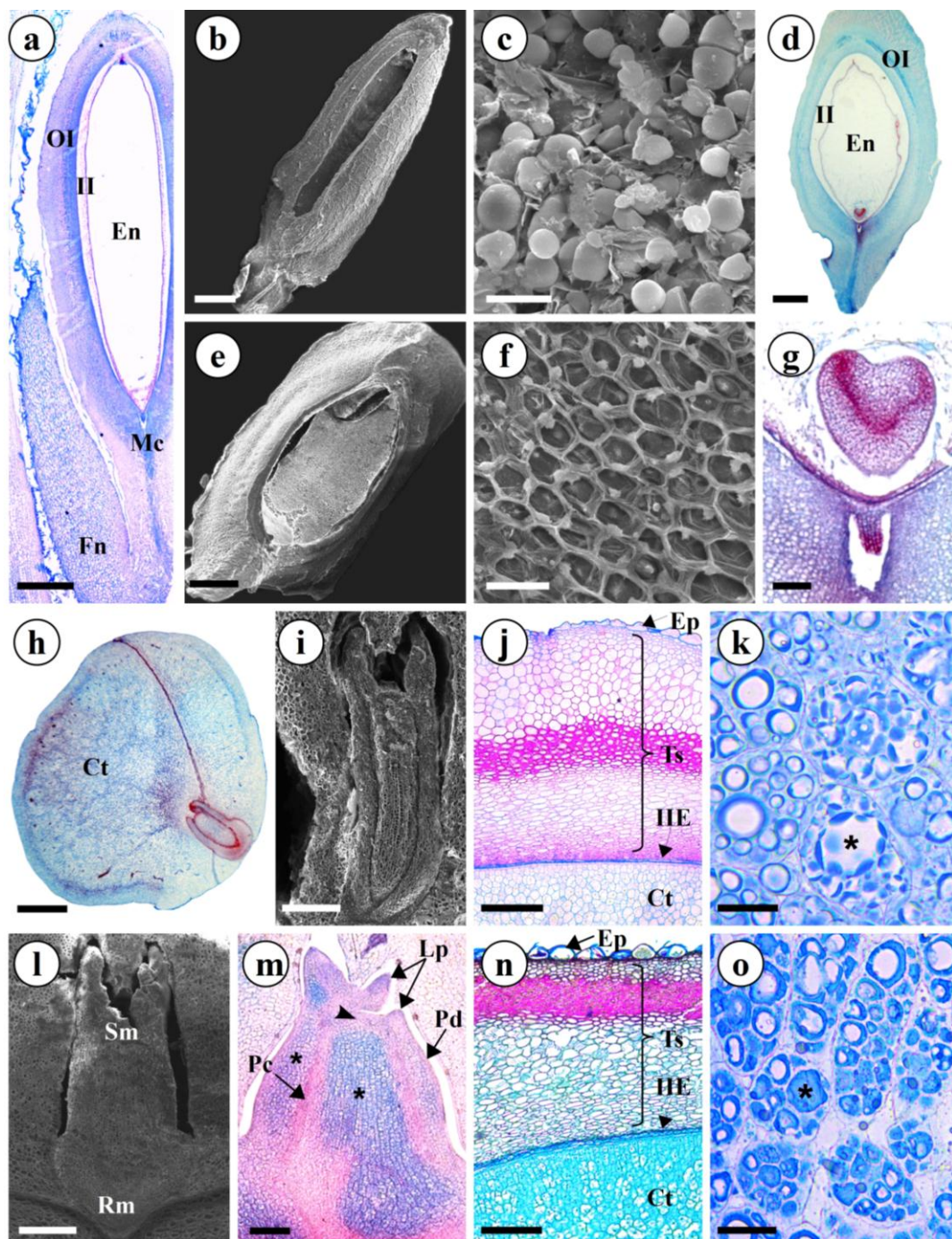
Four different stages (15, 30, 60, and 90 DAA) were selected for examination to correspond with *M. oleifera* seed development. The seed coloration varied from greenish in the early stages and earlier maturation period (15, 30, and 60 DAA) to brownish in the latter maturation phase (90 DAA) (Fig. 8).

Figure 8 - *Moringa oleifera* fruit and seed at different developmental stages. Immature fruits and seeds at 15 DAA (a, b) and 30 DAA (c, d); e, f maturing fruits and seeds at 60 DAA; g, h mature fruits and seeds at 90 DAA. Scale bar: a 3 cm; b 1.5 cm; c 3 cm; d 2.5 cm; e 3 cm; f 3.5 cm; g 3 cm; h 2 cm.



The first stage, at 15 DAA, was marked by the beginning of cell layer differentiation in both the outer and inner integuments (Fig. 9a, b). Numerous starch grains were detected in the integument (Fig. 9c). In this stage, the seed has a globular embryo, and endosperm cellularization was initiated. At 30 DAA, the outer integument separated into two layers (exotesta and endotesta), and the cells started dividing to initiate seed wing formation (Fig. 9d, e). Numerous starch grains were also verified in both developing testa layers. The embryo developed into the cordiform stage and was surrounded by the endosperm, which had completed cellularization (Fig. 9f, g). At the following stages (from 60 to 90 DAA), the endosperm was completely consumed by the growing embryo, and the cotyledons became clearly distinguishable and had filled most of the seed (Fig. 9h). These last stages were also characterized by seed wing and coat maturation. At the third stage (60 DAA), the embryonic axis was completely differentiated (Fig. 9i). In addition, the seed coat presented a papillate epidermis, testa (exotesta and endotesta) cells containing many starch grains, and remnants of the inner integument (tegmen) (Fig. 9j). In addition, deposition of lipophilic compounds and proteinaceous material into the protein storage vacuoles (PSVs) was observed in the cotyledonary cells (Fig. 9k). The last stage analyzed (90 DAA) was characterized by seed desiccation. The embryonic axis exhibited meristematic zones that were developed (i.e., protoderm, ground meristem, procambium, shoot, and root meristem) (Fig. 9l, m). The seed coat consisted mainly of sclerified cells, which created a physical barrier around the mature seed (Fig. 9n). Numerous starch grains accumulated in the testa and lipids in cotyledon cells. Moreover, at 90 DAA, dense proteinaceous inclusions into PSVs of the cotyledonary cells were observed (Fig. 9o).

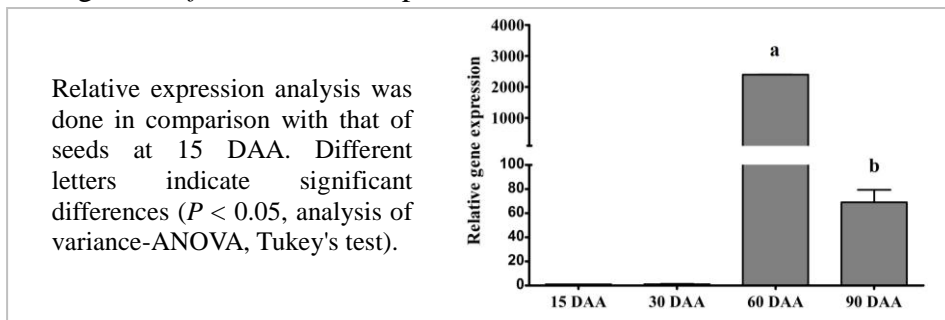
Figure 9 - Scanning electron and optical micrographs of a representative *M. oleifera* seed at different developmental stages. **a-c** Seed at 15 DAA. Longitudinal sections (**a-b**) and starch grains observed in the integument (**c**). **d-g** Seed at 30 DAA. Longitudinal sections (**d-e**), detail of cellular endosperm (**f**) and cordiform embryo (**g**). **h-k** Seed at 60 DAA. Longitudinal section (**h**), embryonic axis (**i**); seed coat (**j**) and cotyledonary cells (**k**). **l-o** Seed at 90 DAA. Embryonic axis (**l-m**); seed coat (**n**) and cotyledonary cells (**o**). Asterisks: protein inclusions into PSVs in the sections stained with CBB (**k, o**) and ground meristem (**m**). Cotyledon (Ct), endosperm (En), epidermis (Ep), epidermis of the inner integument (IIE), funiculus (Fn), inner integument (II), leaf primordium (Lp), micropyle (Mc), outer integument (OI), procambium (Pc), protoderm (Pd), root meristem (Rm), shoot meristem (Sm), testa (Ts). Scale bars: (a, d) 700 μm ; (b, h) 500 μm ; (c) 10 μm ; (e) 1 mm; (f, k) 50 μm ; (g) 100 μm ; (i) 250 μm ; (j, n) 200 μm ; (l) 250 μm ; (m) 150 μm ; (o) 30 μm .



4.3.2 Gene expression pattern of *Mo*-CBPs during the seed development

The relative expression profile of genes encoding *Mo*-CBPs during the *M. oleifera* seed development was investigated by RT-qPCR. *Mo*-CBPs' transcripts were not detected in the seeds at 15 DAA and 30 DAA. However, they accumulated at the late seed developing stages (60 and 90 DAA) with the highest expression level at 60 DAA. At 90 DAA the gene expression level decreased (≈ 35 -fold) significantly ($P < 0.05$) (Fig. 10).

Figure 10 - Relative expression pattern of genes that encode *Mo*-CBPs during *M. oleifera* seed development.



4.3.3 Cross-reactivity between *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄ isoforms against the polyclonal antibodies raised against *Mo*-CBP₄

The double immunodiffusion reactions conducted showed that the anti-*Mo*-CBP₄ specifically recognized and has affinity to *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄, but not to BSA, protein used as control (Fig. 11a).

4.3.4 Detection and quantification of *Mo*-CBPs in the protein fractions from *M. oleifera* seeds

SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions revealed that *Mo*-CBPs are composed of two protein bands with apparent molecular masses around of 18 and 23 kDa (Fig 11b). *M. oleifera* seeds at 15, 30, 60, and 90 DAA contained 0.45, 0.48, 0.58, and 8.15 mg of ALB protein per gram of seed flour, respectively. However, *Mo*-CBPs were not detected (ELISA) in seeds at 15 DAA and 30 DAA. At 60 DAA and 90 DAA, 0.22 and 5.87 mg protein per gram of seed flour were recovered (Fig 11c; Table 2). At 60 DAA, *Mo*-CBPs represented about 6.55% and 20.38% of ALB and *Mo*-CBP_{ef}, respectively. At 90 DAA, *Mo*-CBPs amounted 5.30% and 64.49% of ALB and *Mo*-CBP_{ef}, respectively (Table 2).

Figure 11 - Immunological cross-reactivity analysis and partial purification of *Mo*-CBPs from *M. oleifera* seed. **a** Cross-reactivity of the polyclonal antibodies raised against *Mo*-CBP4 with *Mo*-CBPs by Ouchterlony double immunodiffusion assay. Lines of precipitation of antigen-antibody complexes indicate the ability of the anti-*Mo*-CBP4 (1) to recognize *Mo*-CBP₂ (2), *Mo*-CBP₃ (3), *Mo*-CBP₄ (4). Control: BSA (5). **b** SDS-PAGE of the albumin fraction (ALB) from seeds at 15 DAA to 90 DAA (Lanes 1-4, respectively) and *Mo*-CBP₂ (Lane 5), *Mo*-CBP₃ (6), *Mo*-CBP₄ (7). Molecular mass markers (M): Phosphorylase b (97 kDa); bovine serum albumin (66 kDa); ovalbumin (45 kDa); carbonic anhydrase (29 kDa); soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and lactalbumin (14.4 kDa). **c** Affinity chromatography of ALB from seeds at 15 DAA to 90 DAA. ALB (5 mg protein) was applied to a chitin column previously equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.15 M NaCl. Peak 1 (NRP) contained the non-retained proteins eluted with the equilibrium buffer; the chitin adsorbed peak 2 (*Mo*-CBP_{ef}) was eluted with 0.05 M acetic acid (arrows). Fractions (2 mL) were collected at 0.05 mL/min flow rate.

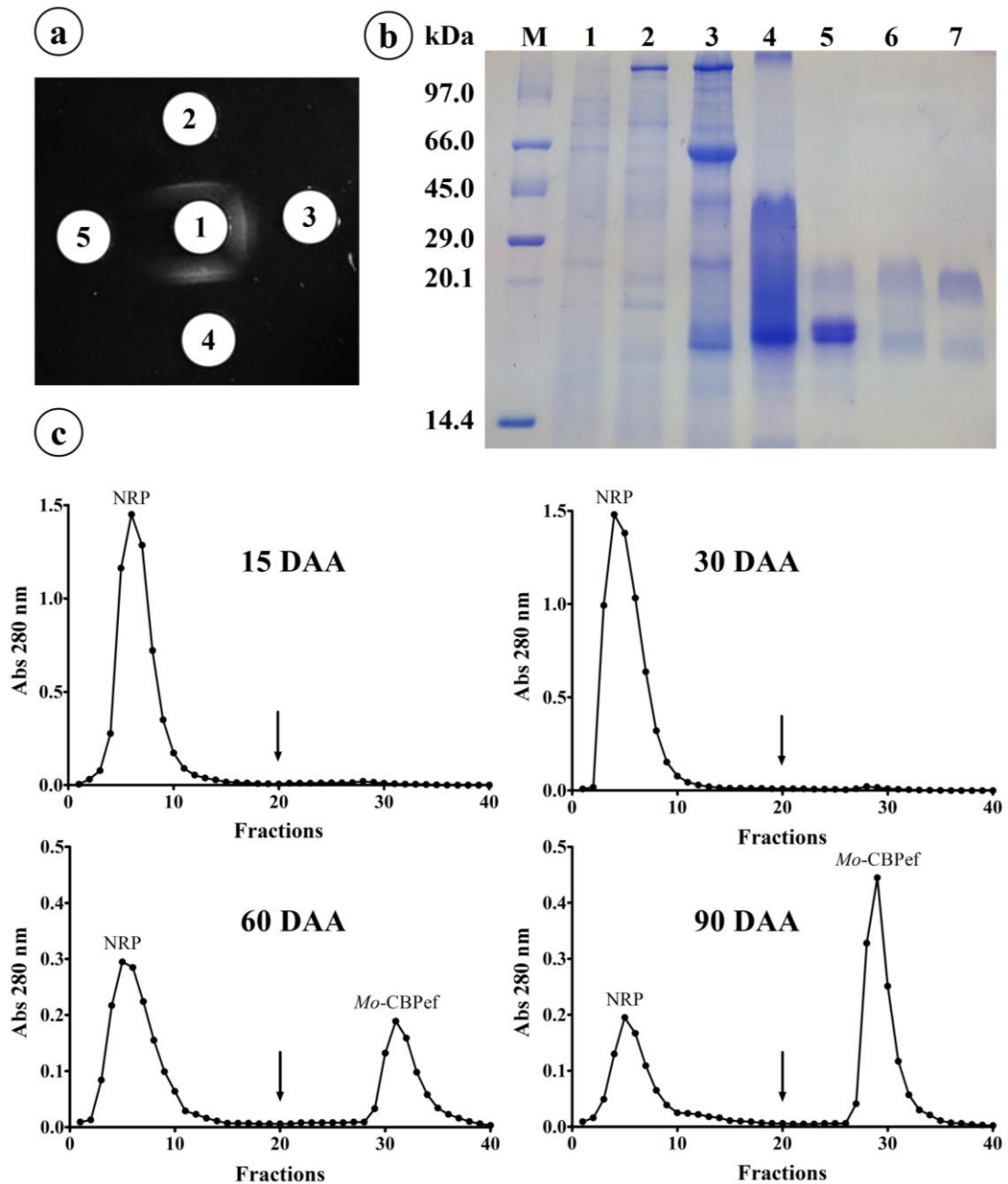


Table 2 - Total protein and *Mo*-CBPs' contents^A in one gram of *M. oleifera* seed at different developing stages (days after anthesis). ^AData represent the mean \pm standard deviation of six similar experiments. Different letters within the same column represent significant difference (Tukey's multiple comparison test, $P < 0.05$). ALB (albumin fraction); *Mo*-CBPef (chitin-binding protein-enriched fraction); ND (not detected). ^BValues were calculated based on ELISA.

Seed (DAA)	Protein fractions	Total protein (mg)	<i>Mo</i> -CBPs (%) ^B
15	ALB	0.45 ± 0.12^b	ND
	<i>Mo</i> -CBPef	ND	ND
30	ALB	0.48 ± 0.32^b	ND
	<i>Mo</i> -CBPef	ND	ND
60	ALB	0.58 ± 1.91^b	6.55 ± 1.52^a
	<i>Mo</i> -CBPef	0.22 ± 0.05^b	20.38 ± 0.89^b
90	ALB	8.15 ± 0.01^a	5.30 ± 2.68^a
	<i>Mo</i> -CBPef	5.87 ± 0.01^a	64.49 ± 13.76^a

4.3.5 *In situ* localization of *Mo*-CBPs in *M. oleifera* seeds

Mo-CBPs were not detected in the seed tissues at 15 DAA and 30 DAA (Fig. 12a-b). No immunolabeling was seen in the integuments or embryo at 60 DAA and 90 DAA (Figs. 12c-d). At 60 DAA, a weak immunoreactivity signal of *Mo*-CBPs with the polyclonal antibodies raised against *Mo*-CBP₄ was detected, in spite of the red chlorophyll autofluorescence also observed in the cotyledonal cells (Fig. 12e). This immunoreactivity between *Mo*-CBPs and anti-*Mo*-CBP₄ became stronger at 90 DAA, especially in the PSVs of the cotyledonal cells that accumulated large amounts of these proteins (Fig. 12f-g).

At the early stages of germination the *M. oleifera* seeds (Fig. 13) showed visible green colored PSVs. This indicates the presence of *Mo*-CBPs. Indeed, a strong *Mo*-CBPs labeling was detected in the cotyledonal cells of dry mature seeds, at 90 DAA, and the germinating seeds at 24 and 48 HAS (Fig. 14a-c). Thereafter, this *Mo*-CBPs signal declined vertiginously at 72 and 96 HAS (Fig. 14d-e). Control sections, prepared in the absence of primary antibody, did not exhibit significant fluorescence above the background levels (Fig. 14f).

Figure 12 - *In situ* localization of *Mo*-CBPs in a representative *M. oleifera* seed at different developmental stages by confocal laser scanning microscopy. **a-b** Longitudinal sections of seed at 15 DAA (**a**) and 30 DAA (**b**) showing the absence of *Mo*-CBPs. **c-d** Absence of *Mo*-CBPs in the embryonic axis at 60 DAA (**c**) and 90 DAA (**d**). **e** Seed at 60 DAA showing a weak signal of *Mo*-CBPs immuno-reactivity in the cotyledonal cells **f-g** Seed at 90 DAA. *Mo*-CBPs accumulated into PSVs of the cotyledonal cells as indicated by the intense staining with FITC (green fluorescence). Embryo epidermis autofluorescence (green). Chlorophyll autofluorescence (red). Scale bars: (a, b, f) 100 μ m; (c-d) 200 μ m; (e) 20 μ m; (g) 25 μ m.

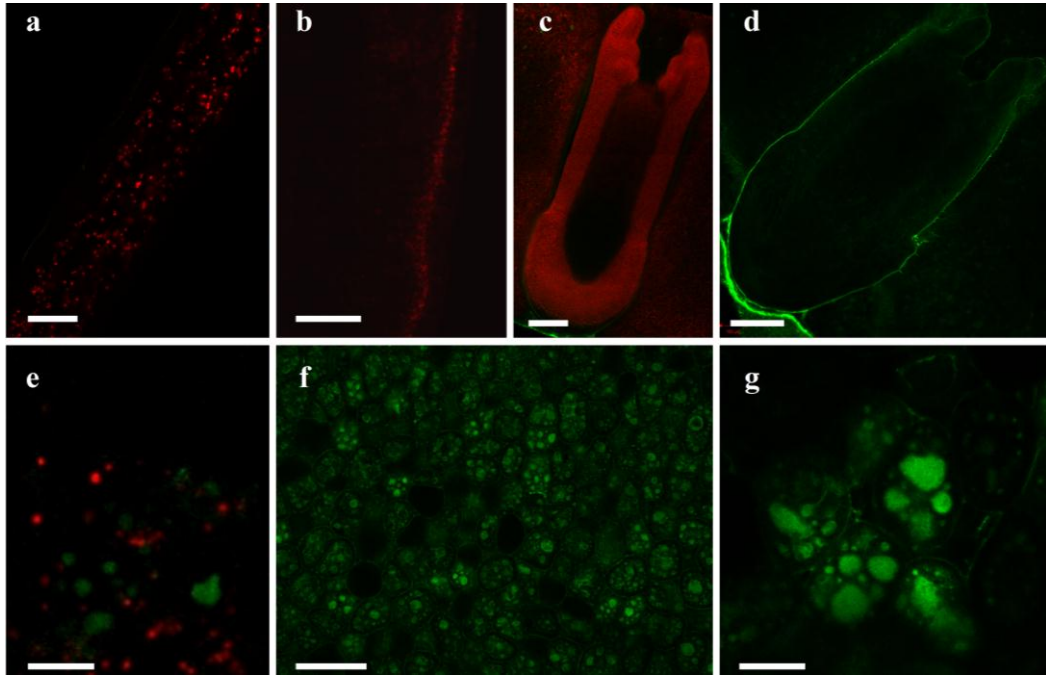


Figure 13 - Stereomicroscope photographs of a representative *M. oleifera* seed showing changes in the embryo during germination. **a-b** Dry seed (at 90 DAA), detail of embryonic axis in **b** (arrow). **c** Seed at the testa rupture phase showing the embryonic axis (arrow) 24 hours after sowing (24 HAS). **d-f** Seeds at the elongation phase of the embryonic axis and protrusion of radicle (asterisks). **d** 48 HAS. **e** 72 HAS. **f** 96 HAS. Integuments are not shown in the figure. Scale bar: 1 mm (a-f).

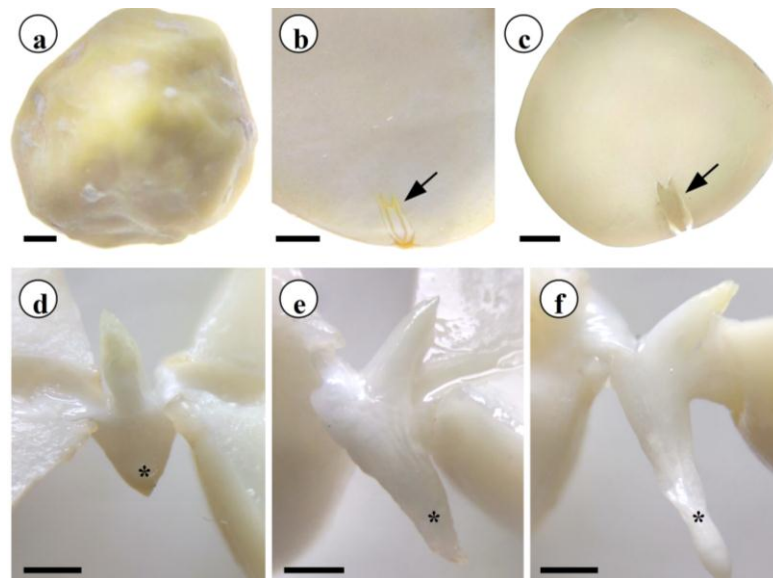
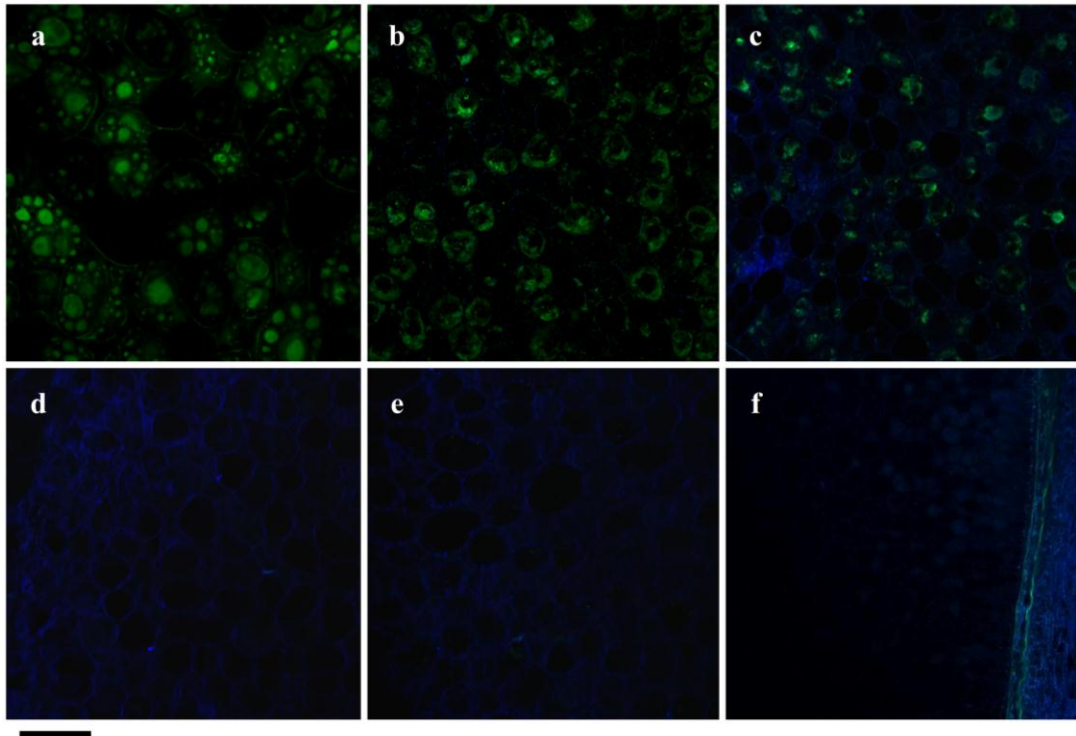


Figure 14 - *In situ* localization of *Mo*-CBPs in the cotyledon cells of a representative *M. oleifera* seed during germination. *Mo*-CBPs' detection in sections of the dry seed (at 90 DAA) (a), germinating seed at 24 HAS (b), and 48 HAS (c) treated with anti-*Mo*-CBP₄. d-e The absence of *Mo*-CBPs in the seed at 72 HAS (d) and 96 HAS (e) suggests they were degraded in the last stages of germination. Sterile distilled water was the negative control (f). Scale bar: (a, f) 50 μ m; (b-e) 100 μ m.



4.3.6 Inhibition of *Fusarium* spp. spore germination by the protein fractions from *M. oleifera* seeds

The spore germination of *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, and *F. solani* was inhibited by *Mo*-CBP_{ef} (0.1 mg protein/mL) isolated from *M. oleifera* seeds at 60 DAA (Fig. 15b, h, n) and 90 DAA (Fig. 15c, i, o). Likewise, *Mo*-CBP₂ (Fig. 15d, j, p, respectively), *Mo*-CBP₃ (Fig. 15e, k, q, respectively), and *Mo*-CBP₄ (Fig. 15f, l, r, respectively), all at 0.1 mg protein/mL, inhibited these pathogens in comparison to the corresponding controls (Fig. 15a, g, m). In contrast, ALB from seeds at 15 DAA and 30 DAA and NRP from seeds at 60 DAA and 90 DAA had no inhibitory effect (Fig. 16). However, *Mo*-CBP_{ef} from seeds at 60 DAA and 90 DAA resulted in 96–100% inhibition of spore germination of the tested fungi (Fig. 15c, h–i, n–o), except *F. oxysporum*, which was less affected (58% inhibition) by *Mo*-CBP_{ef} from seeds at 60 DAA (Fig. 15b). *Mo*-CBPs completely inhibited (100%) the spore germination of all tested fungi (Fig. 15d–f, j–l, p–r).

Figure 15 - Antifungal activity of *Mo*-CBPs on spore germination. Inhibition effect of *Mo*-CBPs on *F. oxysporum* (b-f), *F. pallidoroseum* (h-l), and *F. solani* (n-r) was compared to sterile distilled water used as the negative control (a, g, m), respectively. Fungal spores were incubated with *Mo*-CBPef from *M. oleifera* seeds collected at 60 DAA (b, h, n) and 90 DAA (c, i, o), and with *Mo*-CBP₂ (d, j, p), *Mo*-CBP₃ (e, k, q), and *Mo*-CBP₄ (f, l, r). Samples were assayed at 0.1 mg protein/mL concentration. Scale bar: (a-r) 100 μ m.

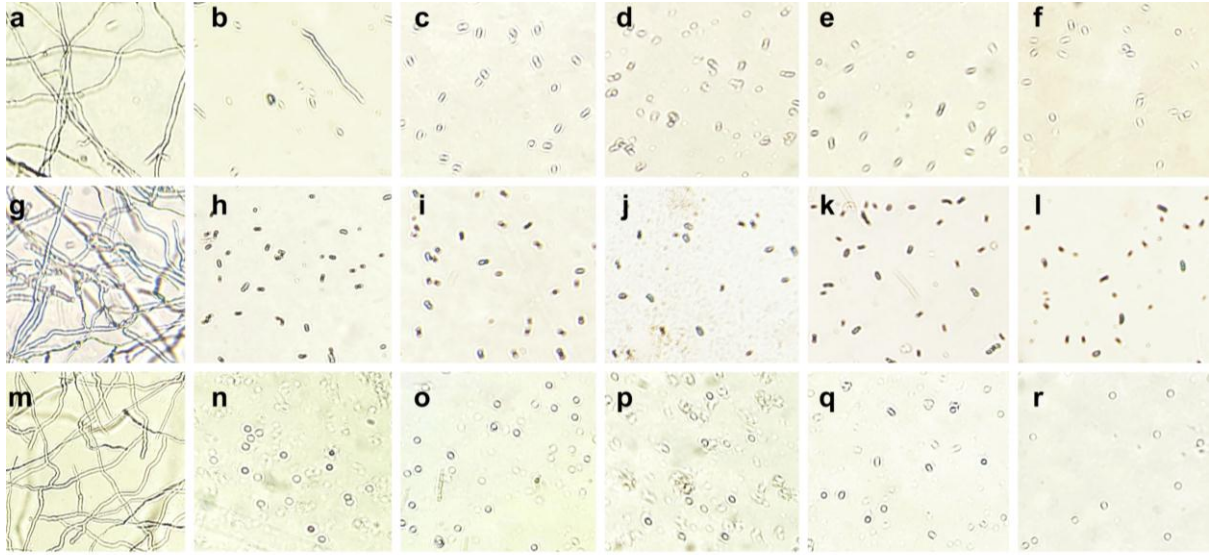
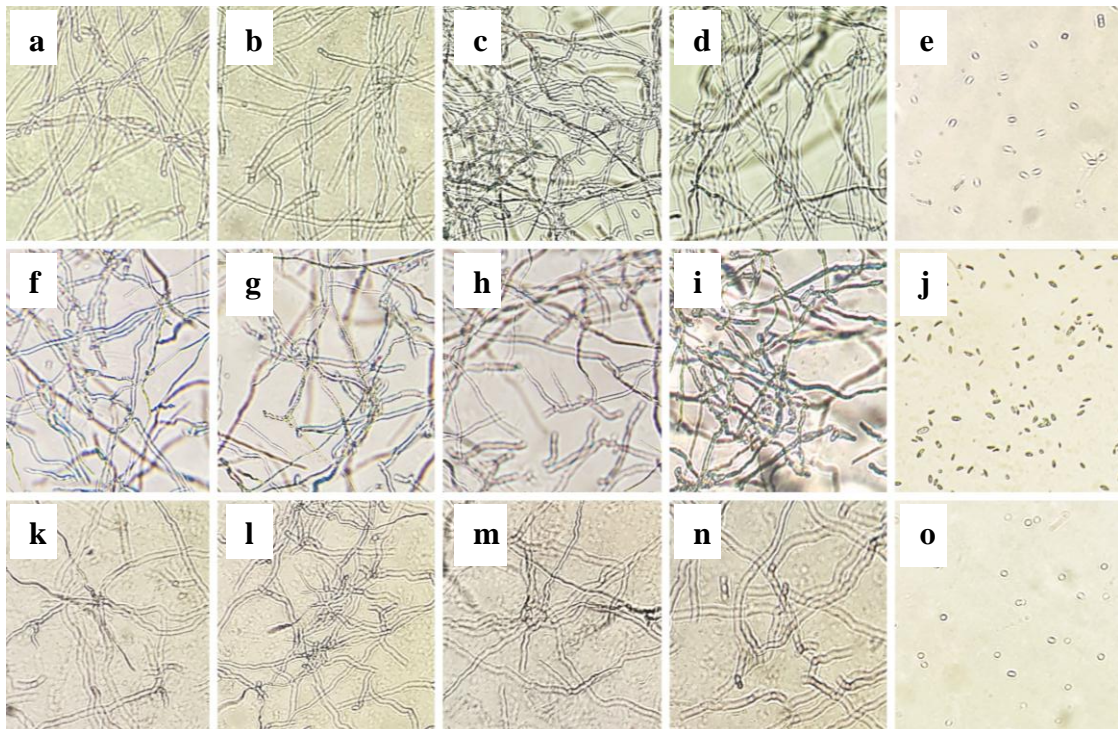


Figure 16 - Optical micrographs showing the absence of growth inhibition of fungi incubated with protein fractions isolated from *M. oleifera* seeds. *Fusarium oxysporum* (a-e), *F. pallidoroseum* (f-j) and *F. solani* (k-o). Albumin fraction from seeds at 15 DAA (a, f, k) and 30 DAA (b, g, l). NRP from seeds at 60 DAA (c, h, m) and 90 DAA (d, i, n). All samples were used at a 0.1 mg protein/mL concentration. (e, j, o) Ungerminated spores in 0.1 MH_2O_2 (positive control). Scale bar: a-o 100 μ m.



4.4 Discussion

In this report, we present novel anatomical aspects on the development of *M. oleifera* seeds. Our results permitted the identification of four seed developing stages: globular embryo (15 DAA), cordiform embryo (30 DAA), maturing embryo (60 DAA), and mature embryo (90 DAA) (Figs. 8 and 9). Muhl et al. (2016) considered several phases of *M. oleifera* seed development based on the fruit diameter and they provide information on a globular stage (8 mm), followed by a histo-differentiation phase (8-24 mm) and maturation of seed (24-26 mm). However, to the best of our knowledge, it is the first time that cordiform stage (30 DAA) in the developing *M. oleifera* seed, being reported here. Anatomical features of *M. oleifera* seed observed in the present study revealed that this species presents the same pattern of embryogenesis observed in other Brassicales species, such as *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al. 2014; Fiume et al. 2016; Di Berardino et al. 2018).

Recent findings by Muhl et al. (2014, 2016) have showed that the histo-differentiation phase of *M. oleifera* seed is marked by expansion of the cotyledons and deposition of storage compounds such as lipids and proteins. Similarly, the *M. oleifera* embryo morphogenesis observed here was characterized mainly by cell expansion and deposition of storage reserves (Fig. 9) however; we focused on kinetic of protein accumulation. A particular phase of seed development that involves cell division and expansion, and massive deposition of storage compounds have been referred as “seed filling” (Agrawal and Thelen 2006; Verdier and Thompson 2008). Proteins accumulated during seed filling have important impact on grain nutritional quality (Shewry and Halford 2002). *M. oleifera* seeds contain about 33 to 38% proteins by dry weight and this content is relatively higher than those reported for important cereal grains with 10-12% proteins/dry weight (Oliveira et al. 1999; Ferreira et al. 2008).

Seed storage proteins (albumins, globulins, prolamins, and glutelins) are multifunctional molecules (Shewry and Halford 2002). However, they serve primarily as sources of amino acids, nitrogen, and carbon for use during germination and seedling growth. Some of these proteins, due their insecticidal and antimicrobial properties, may also be involved in plant defense (Cândido et al. 2011). The 2S albumins from *Raphanus sativus* seeds inhibited fungi (including *F. culmorum* and *F. oxysporum*) and bacteria (*Bacillus megaterium* and *Erwinia carotovoru*) (Terras et al. 1992, 1993). The 2S albumin isolated from *Wrightia tinctoria* seeds has antimicrobial activity against the Gram-negative bacterium *Morexalla catarrhalis* and Gram-positive *Bacillus subtilis* (Sharma et al. 2017). Thus, it is

possible that during the evolutionary process plants evolved an efficient way to save cell energy by synthesizing a unique molecule with two (or more) distinct and essential physiological functions (Maria-Neto et al. 2011).

The three isoforms of chitin-binding proteins (*Mo*-CBPs) from *M. oleifera* seeds, named *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄, were characterized as members of the 2S albumin protein family (Pereira et al. 2011; Batista et al. 2014; Freire et al. 2015; Neto et al. 2017). However all isoforms have antifungal properties. Here, we evaluated the gene expression in parallel with accumulation and degradation of *Mo*-CBPs in developing and germinating *M. oleifera* seeds, respectively, to test whether these proteins behave as storage and/or defense proteins. We found that the genes encoding *Mo*-CBPs were not expressed in the early stages of the embryonic development (globular and cordiform embryo) at 15 and 30 DAA. However, these genes were highly expressed during the seed filling period, at 60 DAA, when the seeds attained their final size. At this period, desiccation had not yet started and the *Mo*-CBPs' transcript levels declined in the dry seed at 90 DAA (Fig. 10). These patterns of temporal expression observed for *Mo*-CBPs are similar to those of genes that code 2S albumins from other oilseed plants like *A. thaliana*, *R. communis*, and *Sesamum indicum* (Tai et al. 2001; Lara et al. 2003; Chen et al. 2004). Guerche et al. (1990) studied four different genes that code 2S albumins in *A. thaliana* and found that their expression levels increased significantly during seed filling (4 to 10 days after pollination) and decreased in dry seed. In *A. thaliana* and in most of non-endospermic species, such as *M. oleifera*, the seed filling period is a critical stage for the synthesis of storage compounds, which are deposited particularly in cotyledons (Baud et al. 2008; Gallão et al. 2006; Muhl et al. 2014, 2016; Chen et al. 2015; Fotouo-M et al. 2015).-

Accumulation of *Mo*-CBPs evaluated by ELISA was consistent with the gene expression profile at transcriptional level during the course of *M. oleifera* seed development. *Mo*-CBPs were not detected in seeds at 15 DAA and 30 DAA. *Mo*-CBPs were only detected at the last seed maturation stages, corresponding approximately to 6.5% and 5.3% of the total protein content from ALB isolated from seeds at 60 DAA and 90 DAA, respectively. In *Mo*-CBPef the *Mo*-CBPs' content at 60 DAA comprised 20.4% and at 90 DAA 64.5% of the total proteins, indicating high accumulation of *Mo*-CBPs in the last seed maturation stage (Table 2).

In situ localization analysis confirmed that *Mo*-CBPs were present only during the *M. oleifera* seed maturation at 60 and 90 DAA. As expected, *Mo*-CBPs immunolabeling in the seed tissues was less intense in the cotyledons at 60 DAA. *Mo*-CBPs immunolabeling became

more intense in the dry seed at 90 DAA, when a uniform distribution in the cotyledonary mesophyll, particularly, into the protein storage vacuoles was observed (Fig. 12). *In situ* localization analysis also revealed that *Mo*-CBPs were degraded at the end of the germination period. Immunolabeling of *Mo*-CBPs in the cotyledonary cells was more intense in the germinating seed at 24 and 48 HAS and decreased at the last stages of germination as they were not detected at 72 and 96 HAS (Fig. 14). This dynamic of *Mo*-CBPs' degradation after seed imbibition was consistent with the pattern reported for other storage proteins, including the 2S albumins of *Lycopersicon esculentum* (Lec2SA) (Oguri et al. 2003) and *R. communis* (Ahn and Chen 2007). In general, the breakdown of these proteins is required during the germination process to support the growing seedlings before the photosynthetic capacity is acquired (Müntz et al. 2001; Kim et al. 2011). Interestingly, in *R. communis* both prepro2S albumin and mature 2S albumin were accumulated in the dry seed and subsequently were degraded during the germination process. As both molecular forms have trypsin inhibitor family domains, it is possible that they also serve as plant defense proteins in addition to storage. Besides the ability to inhibit proteolytic enzymes, 2S albumins can also be deleterious to phytopathogenic bacteria and fungi (Costa et al. 2015). It is believed that the plant storage proteins with antimicrobial activity play an important role as defense molecules during the seed germination and early stages of their development. At these periods of vulnerability to natural enemies, the more complex defense system has yet not developed (Wang et al. 2001).

A broad-spectrum of *Mo*-CBP₃ activity against phytopathogenic fungi was previously reported by our research group (Gifoni et al. 2012; Batista et al. 2014). Here we tested whether the other two isoforms, *Mo*-CBP₂ and *Mo*-CBP₄, have similar behavior. *Mo*-CBP₂ and *Mo*-CBP₄ also inhibited the conidial germination of the *Fusarium* species tested. (Fig. 15). In addition, amongst the protein fractions isolated from developing *M. oleifera* seeds at different stages tested, only *Mo*-CBP_{ef} inhibited the fungus spore germination (Figs. 15-16). These findings reinforce the hypothesis of a defensive role for *Mo*-CBPs (*Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄), at the last developmental stages of *M. oleifera* seeds. These chitin-binding protein isoforms may protect the growing embryo against phytopathogen fungi. As mentioned above, antifungal activity has been identified in a wide variety of plant 2S albumins. The first 2S storage albumins described as a novel class of antifungal proteins were isolated from the Brassicaceae species *R. sativus*, *Brassica napus*, *B. rapa*, *Sinapis alba*, and *A. thaliana*. These plants belong to the same order that includes *M. oleifera* (Terras et al. 1992; Terras et al. 1993). Nevertheless, several antifungal 2S albumins isolated from plant

species belonging to different botany families were described: *Arachis hypogaea* (Fabaceae), *Capsicum annuum* (Solanaceae), *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae), *Malva parviflora* (Malvaceae), *Passiflora edulis* (Passifloraceae), *Putranjiva roxburghii* (Euphorbiaceae), and *Taraxacum officinale* (Asteraceae) (Wang and Bunkers et al. 2000; Agizzio et al. 2006; Pelegrini et al. 2006; Odintsova et al. 2010; Ribeiro et al. 2012; Duan et al. 2013; Tomar et al. 2014a, b).

It is important to emphasize that *Mo*-CBPs (*Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, and *Mo*-CBP₄) are merolectins. They possess a unique carbohydrate binding site that binds to both *N*-acetyl-D-glucosamine and chitin (Pereira et al. 2011; Gifoni et al. 2012; Neto et al. 2017). The antifungal activity of *Mo*-CBPs is supposed to be associated with their chitin-binding property. This probably allows binding of these proteins to the fungal cell wall leading to interference in its structure. A number of studies have indicated that the antifungal activity of some chitin-binding proteins that hydrolyze chitin seems to be more dependent on the presence of the chitin-binding domain rather to the catalytic activity (Iseli et al. 1993; Garcia-Casado et al. 1998; Theis and Stahl 2004; Jashni et al. 2015). It has been suggested that binding of these molecules to chitin of yeasts and filamentous fungi leads to increase of cell membrane permeabilization and reactive oxygen species production, as in the case of *Mo*-CBP₂ and *Mo*-CBP₃ and other plant chitin-binding proteins (Huang et al. 2000; Van den Bergh et al. 2004; Batista et al. 2014; Neto et al. 2017).

In conclusion, we report herein the gene expression and localization of *Mo*-CBPs in *M. oleifera* seeds. Our findings indicate that: (1) the seed maturation process is characterized by a dramatic accumulation of *Mo*-CBPs' transcripts and their encoded proteins in the cotyledon cells; (2) *Mo*-CBPs behave as storage proteins and are degraded during the last seed germination stages; (3) during the embryonic development, *Mo*-CBPs may act as defensive proteins against pathogenic fungi, which characterize the multifunctional role of these proteins.

Author contribution statement

IMV, DOBS and JTAO conceived and designed the research, critically revised the paper, contributed to the analysis of the results, and to the writing of the manuscript. TBG, HPSC and LCBRB conducted most of the experiments, analyzed the data, and wrote the first draft of the manuscript. AAS and TBG performed the *in situ* localization assay and analysis of the results. JHC and FDAS designed the RT-PCR assay. MRA and JXSN participated in the

experiments. All authors discussed the results and approved the manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazilian Ministry of Education, Process Number: 306202/2017-4, grant number 1280942/2014-2018) CAPES - Toxinology Project, Process Number: 431511/2016-0; the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Process number: 306202/2017-4). We also are grateful to the Central Analytical facilities of the Federal University of Ceara, Brazil, for the scanning electron micrograph (SEM) analysis.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors hereby declare no conflicts of interest.

References

AGIZZIO, A. P. *et al.* The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Sci.**, v. 171, p. 515–522, 2006.

AGRAWAL, G.K.; THELEN, J. J. Large scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape. **Mol. Cell Proteomics**, v. 5, p. 2044-2059, 2006.

AHN, Y. J.; CHEN, G. Q. Temporal and spatial expression of 2S albumin in castor (*Ricinus communis* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 10043-10049, 2007.

AL-ASMARI, A. K. *et al.* *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. **PLoS One**, v. 10, p. e0135814, 2015.

ALI, N. F.; EL-MOHAMEDY, R. S. R. Evaluation of *Moringa oleifera* seed extract coagulation in removal of some dyes in textile wastewater. **Int. J. ChemTech Res.**, v. 9, p. 538–545, 2016.

AL-MALKI, A. L.; EL RABEY, H. A. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, 381040, p. 1-13, 2015.

ARAÚJO, L. C. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**, v. 8, p. e81973, 2013.

- BATISTA, A. B. *et al.* New insights into the structure and mode of action of *Mo*-CBP₃, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**, v. 9, p. e111427, 2014.
- BAUD, S. *et al.* Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. **The Arabidopsis Book**, v. 6, p. e0113, 2008.
- BECKER-RITT, A. B.; CARLINI, C. R. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. **Biopolymers**, v. 98, p. 367–384, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 10, p. 621–630, 2017.
- CÂNDIDO, E. S. *et al.* Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **FASEB J.**, v. 25, p. 3290–3305, 2011.
- CHEN, G. Q. *et al.* 2S albumin gene expression in castor plant (*Ricinus communis* L.). **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 81, p. 867–872, 2004.
- CHEN, M. *et al.* TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 regulates the accumulation of seed storage reserves in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 169, p. 391-402, 2015.
- CHUANG, P. H. *et al.* Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 232–236, 2007.
- COSTA, T. G. *et al.* Identification of a novel 2S albumin with antitryptic activity from *Caryocar brasiliense* seeds. **J. Agr. Sci.**, v. 6, p. 197-206, 2015.
- DUAN, X. H. *et al.* Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 66, p. 84–90, 2013.
- FERREIRA, P. M. P. *et al.* *Moringa oleifera*: Bioactive compounds and nutritional potential. **Rev. Nutr.**, v. 21, p. 431-437, 2008.
- FISHER, D. B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92–96, 1968.
- FOTOUO-M, H.; TOIT, E. S.; ROBBERTSE, P. J. Germination and ultrastructural studies of seeds produced by a fast-growing, drought-resistant tree: implications for its domestication and seed storage. **AoB Plants**, v. 7, plv016, 2015.
- FREIRE, J. E. C. *et al.* *Mo*-CBP₃, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PLoS One**, v. 10, p. e0119871, 2015.

- GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. Chemical and structural evaluation of moringa seeds. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 37, p. 106–109, 2006.
- GARCIA-CASADO, G. *et al.* Site-directed mutagenesis of active site residues in a class I endochitinase from chesnut seeds. **Glycobiology**, v. 8, p. 1021–1028, 1998.
- GERLACH, D. (1984) *Botanische Mikrotechnik: eine Einführung*. 3rd ed. Georg Thieme, Stuttgart, Germany.
- GIFONI, J. M. *et al.* A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, v. 98, p. 406–415, 2012.
- GUERCHE, P. *et al.* Differential expression of the *Arabidopsis* 2S albumin genes and the effect of increasing gene family size. **Plant Cell**, v. 2, p. 469–478, 1990.
- HARBOE, N.; INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In: AXELSEN, N. H. (ed) **A manual quantitative immunoelectrophoresis**. London: Blackwell Scientific Publications, 1973. p. 161–164.
- HELLEMANS, J. *et al.* qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol.**, v. 8, R19, 2007.
- HUANG, X.; XIE, W. J.; GONG, Z. Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Lett.**, v. 478, p. 123–126, 2000.
- ISELI, B.; BOLLER, T.; NEUHAUS, J. M. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 221–226, 1993.
- JASHNI, M. K. *et al.* Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, p. 996–1008, 2015.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: Principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman & Company, 1962.
- JI, C.; KÚC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 49, p. 257–265, 1996.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.
- JUNQUEIRA, C. U. O uso de cortes finos de tecidos na Medicina e Biologia. **Meios e Métodos**, v. 66, p. 167-171, 1990.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, p. 137-138, 1965.

- KEOGH, M. B. *et al.* Evaluation of the natural coagulant *Moringa oleifera* as a pretreatment for SODIS in contaminated turbid water. **Sol. Energy**, v. 158, p. 448–454, 2017.
- KIM, H. T. *et al.* Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1814, p. 1178–1187, 2011.
- KIM, Y. J. *et al.* Cloning and characterization of pathogenesis-related protein 4 gene from *Panax ginseng*. **Russ. J. Plant Physiol.**, v. 61, p. 664–671, 2014.
- KRÜGEL, U. *et al.* Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. **Plant Cell**, v. 20, p. 2497–2513, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LARA, P. *et al.* Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and Two bZIPs related to OPAQUE2. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 21003–21011, 2003.
- LEONE, A. *et al.* Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p. 12791–12835, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOPES, T. D. P. **Potencial antidermatofítico de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera***. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, 2016.
- MARIA-NETO, S. *et al.* Bactericidal activity identified in 2S albumin from sesame seeds and in silico studies of structure-function relations. **Protein J.**, v. 30, p. 340–350, 2011.
- MUHL, Q. E.; DTOIT, E. S.; STEYN, J. M. Irrigation amounts affect the compositional changes of *Moringa oleifera* seeds throughout different developmental stages. **Int. J. Agric. Biol.**, v. 16, p. 201–206, 2014.
- MUHL, Q. E. *et al.* The embryo, endosperm and seed coat structure of developing *Moringa oleifera* seed. **South African J. Bot.**, v. 106, p. 60–66, 2016.
- MÜNTZ, K. *et al.* Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **J. Exp. Bot.**, v. 52, p. 1741–1752, 2001.
- NETO, J. X. S. *et al.* A chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 980, 2017.
- ODINTSOVA, T. I. *et al.* Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. **Protein Pept. Lett.**, v. 17, p. 522–529, 2010.

- OGURI, S. *et al.* Characterization and sequence of tomato 2S seed albumin: a storage protein with sequence similarities to the fruit lectin. **Planta**, v. 216, p. 976-984, 2003.
- OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **J. Sci. Food Agric.**, v. 79, p. 815-820, 1999.
- OLIVEIRA, E. A. P. *et al.* Foliar fungicide and environments on the physiological quality of oat seeds. **J. Seed Sci.**, v. 36, p. 15-24, 2014.
- OUCHTERLONY, O.; NILSSON, L. A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D. M. *et al.* (eds). **Handbook of experimental immunology**. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1986. p. 32.1-32.50.
- PANDEY, A. *et al.* "Drumstick tree" (*Moringa oleifera* Lam.): a multipurpose potential species in India. **Genet. Resour. Crop Evol.**, v. 58, p. 453-460, 2011.
- PAVANKUMAR, A. R. *et al.* Dimerization of a flocculent protein from *Moringa oleifera*: experimental evidence and in silico interpretation. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 32, p. 406-415, 2014.
- PELEGRINI, P. B. *et al.* An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 1141-1146, 2006.
- PEREIRA, M. L. **Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral**. 2014. 210 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, 2014.
- PEREIRA, M. L. *et al.* Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein Pept. Lett.**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.
- RIBEIRO, S. F. F. *et al.* Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. **Protein J.**, v. 31, p. 59-67, 2012.
- RIOS, F. J. B. *et al.* Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* genera. In: VAN DRIESSCHE E. *et al.* (eds) **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Denmark: Textop, 1996. p. 277-284.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SHARMA, A. *et al.* Purification and characterization of 2S albumin from seeds of *Wrightia tinctoria* exhibiting antibacterial and DNase activity. **Protein Pept. Lett.**, v. 24, p. 368-378, 2017.

SHEBEK, K. *et al.* The flocculating cationic polypeptide from *Moringa oleifera* seeds damages bacterial cell membranes by causing membrane fusion. **Langmuir**, v. 31, p. 4496–4502, 2015.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **J. Exp. Bot.**, v. 53, p. 947–958, 2002.

SINGH, R. S. G.; NEGI, P. S.; RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. **J. Funct. Foods**, v. 5, p. 1883–1891, 2013.

SOARES, E. L. *et al.* Proteome analysis of the inner integument from developing *Jatropha curcas* L. seeds. **J. Proteome Res.**, v. 13, p. 3562–3570, 2014.

SUTAR, N. G. *et al.* Analgesic activity of seeds of *Moringa oleifera* Lam. **Int. J. Green Pharm.**, v. 2, p. 108–110, 2008.

TAI, S. S. K. *et al.* Expression pattern and deposition of three storage proteins, 11S globulin, 2S albumin and 7S globulin in maturing sesame seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 39, p. 981–992, 2001.

TERRAS, F. R. G. *et al.* Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 15301–15309, 1992.

TERRAS, F. R. G. *et al.* A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. **FEBS Lett.**, v. 316, p. 233–240, 1993.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 437–455, 2004.

TOMAR, P. P. S. *et al.* Purification, characterisation and cloning of a 2S albumin with DNase, RNase and antifungal activities from *Putranjiva roxburghii*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 174, p. 471–482, 2014a.

TOMAR, P. P. S. *et al.* Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 448, p. 349–354, 2014b.

ULLAH, A. *et al.* Crystal structure of mature 2S albumin from *Moringa oleifera* seeds. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 468, p. 365–371, 2015.

VAN DEN BERGH, K. P. B. *et al.* Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **Planta**, v. 219, p. 221–232, 2004.

VASCONCELOS, I. M. *et al.* SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora soja* growth. **Toxicon**, v. 51, p. 952–963, 2008.

VERDIER, J.; THOMPSON, R. D. Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling. **Plant Cell Physiol.**, v. 49, p. 1263–1271, 2008.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Ann Histochem.*, v. 15, p. 289-296, 1970.

WANG, X.; BUNKERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 279, p. 669–673, 2000.

WANG, X. *et al.* Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 282, p. 1224-1228, 2001.

ZHANG, Y. *et al.* Analysis of global gene expression profiles to identify differentially expressed genes critical for embryo development in *Brassica rapa*. *Plant Mol. Biol.*, v. 86, p. 425–442, 2014.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que as proteínas ligantes à quitina das sementes de *Moringa oleifera* (*Mo*-CBPs) apresentam um importante papel como moléculas de reserva e defesa da planta.

Assim como para outras albuminas 2S, a função de reserva molecular foi evidenciada pela deposição dramática de transcritos de *Mo*-CBPs e suas proteínas correspondentes nos tecidos da semente durante a maturação tardia. Subsequentemente, tais proteínas foram degradadas durante a germinação. Acredita-se que acumulação destas proteínas é um processo crítico para o fornecimento de importantes nutrientes como aminoácidos, carbono e nitrogênio que podem ser alocados para a biogênese da plântula de *M. oleifera*.

No contexto da defesa vegetal, os resultados obtidos mostraram que as *Mo*-CBPs são formas antifúngicas ativas nos últimos estágios de maturação da semente de *M. oleifera*, exercendo severa inibição na germinação de esporos de fitopatógenos, representados aqui por espécies *Fusarium*. A atividade contra fungos fitopatogênicos foi positivamente mostrada para todas as integrantes do grupo de *Mo*-CBPs, destacando o potencial destas proteínas para fins biotecnológicos, especialmente no que concerne ao uso de toxinas vegetais para o controle de diversas doenças em plantas.

Desta forma, as *Mo*-CBPs representam um modelo excepcional de proteínas bifuncionais, acomodando os papéis de armazenamento e defesa vegetal em uma única molécula.

REFERÊNCIAS

- AGIZZIO, A. P. *et al.* The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Sci.**, v. 171, p. 515–522, 2006.
- AGRA-NETO, A. C. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitol. Res.**, v. 113, p. 175–184, 2014.
- ARAÚJO, L. C. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**, v. 8, p. 1–15, 2013.
- BATISTA, A. B. *et al.* New insights into the structure and mode of action of Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**, v. 9, p. 1–9, 2014.
- BECKER-RITT, A. B.; CARLINI, C. R. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. **Biopolymers**, v. 98, p. 367–384, 2012.
- BIJINA, B. *et al.* Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: isolation, purification, and characterization. **Proc. Biochem.**, v. 46, p. 2291–2300, 2011.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 10, p. 621–630, 2017.
- CÂNDIDO, E. S. *et al.* Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **FASEB J.**, v. 25, p. 3290–3305, 2011.
- CHEN, C. H. *et al.* Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. **BMC Plant Biol.**, v. 18, p. 1–11, 2018.
- COSTA, T. G. *et al.* Identification of a novel 2S albumin with antitryptic activity from *Caryocar brasiliense* seeds. **J. Agr. Sci.**, v. 6, p. 197–206, 2015.
- DONLI, P. O.; DAUDA, D. Evaluation of aqueous moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. **Pest Manag. Sci.**, v. 59, p. 1060–1062, 2003.
- DUAN, X. H. *et al.* Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 66, p. 84–90, 2013.
- FANG, E. F. *et al.* Biochemical characterization of the RNA-hydrolytic activity of a pumpkin 2s albumin. **FEBS Lett.**, v. 584, p. 4089–96, 2010.
- FERREIRA, R. B. *et al.* The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Mol. Plant Pathol.**, v. 8, p. 677–700, 2007.
- FERREIRA, R. S. *et al.* Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 53, p. 186–192, 2011.

- FREIRE, J. E. C. *et al.* *Mo*-CBP₃, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PLoS One**, v. 10, p. 1–24, 2015.
- GARCIA-CASADO, G. *et al.* Site-directed mutagenesis of active site residues in a class I endochitinase from chesnut seeds. **Glycobiology**, v. 8, p. 1021–1028, 1998.
- GASSENSCHMIDT, U. *et al.* Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1243, p. 477–81, 1995.
- GHEBREMICHAEL, K. A. *et al.* A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Res.**, v. 39, p. 2338–44, 2005.
- GIFONI, J. M. **Propriedades bioquímicas e funcionais de uma proteína ligante à quitina purificada de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. 2009. 141 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2009.
- GIFONI, J. M. *et al.* A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, v. 98, p. 406–415, 2012.
- GOMES, A. S. **Purificação, caracterização físico-química e biológica de proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. 2002. 100 f. Monografia. Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2002.
- ISELI, B.; BOLLER, T.; NEUHAUS, J. M. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 221–226, 1993.
- ITAKURA, Y. *et al.* Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: a comprehensive study. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, p. 1–23, 2017.
- KATRE, U. V. *et al.* Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 42, p. 203–207, 2008.
- KESARI, P. *et al.* Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. **Proteomics**, v. 15, p. 1693–1705, 2015.
- KINI, S. G. *et al.* Morintides: cargo-free chitin-binding peptides from *Moringa oleifera*. **BMC Plant Biol.**, v. 17, p. 1–13, 2017.
- LENARDON, M. D.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. R. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 13, p. 416–23, 2010.
- LOPES, T. D. P. **Potencial antidermatofítico de *Mo*-CBP₄, uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera***. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, 2016.
- MARIA-NETO, S. *et al.* Bactericidal activity identified in 2S albumin from sesame seeds and in silico studies of structure-function relations. **Protein J.**, v. 30, p. 340–50, 2011.

- MEDEIROS, M. L. S. *et al.* Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 108, p. 782–789, 2018.
- MORENO, F. J.; CLEMENTE, A. 2S Albumin storage proteins: what makes them food allergens? **Open Biochem. J.**, v. 2, p. 16–28, 2008.
- MÜNTZ, K. *et al.* Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **J. Exp. Bot.**, v. 52, p. 1741–52, 2001.
- NAWROT, P. *et al.* Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiol.**, v. 59, p. 181–196, 2014.
- NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Res.**, v. 29, p. 703–10, 1995.
- NETO, J. X. *et al.* A Chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1–12, 2017.
- ODINTSOVA, T. *et al.* Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. **Protein Pept. Lett.**, v. 17, p. 522–529, 2010.
- OLIVEIRA, C. F. R. *et al.* Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochem.**, v. 46, p. 498–504, 2011.
- OSBORNE, T. B. **The Vegetable Proteins**. London: Longmans, Green and Co., 1924.
- PANDEY, A. *et al.* “Drumstick tree” (*Moringa oleifera* Lam.): A multipurpose potential species in India. **Genet. Resour. Crop Evol.**, v. 58, p. 453–460, 2011.
- PARK, S. C. *et al.* Antifungal effect of *Arabidopsis* SGT1 proteins via mitochondrial reactive oxygen species. **J. Agri. Food Chem.**, v. 65, p. 8340–47, 2017.
- PELEGRINI, P. B. *et al.* An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 1141–1146, 2006.
- RIBEIRO, S. M. *et al.* Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins. **Peptides**, v. 32, p. 868–74, 2011.
- RIBEIRO, S. F. F. *et al.* Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. **Protein J.**, v. 31, p. 59–67, 2012.
- SANTOS, A. F. S. *et al.* Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Res.**, v. 39, p. 975–980, 2005.
- SANTOS, A. F. S. *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochem.**, v. 44, p. 504–8, 2009.

SHANK, L. P. *et al.* Peroxidase activity in native and callus culture of *Moringa oleifera* Lam. **J. Med. Bioeng.**, v. 2, p. 163–67, 2013.

SHEBEK, K. *et al.* The flocculating cationic polypeptide from *Moringa oleifera* seeds damages bacterial cell membranes by causing membrane fusion. **Langmuir**, v. 31, p. 4496–4502, 2015.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **J. Exp. Bot.**, v. 53, p. 947–58, 2002.

SHEWRY, P. R. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 945–56, 1995.

SINGH, R. S. G.; NEGI, P. S.; RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. **J. Funct. Foods**, v. 5, p. 1883–1891, 2013.

SULZENBACHER, G. *et al.* Structural basis for carbohydrate binding properties of a plant chitinase-like agglutinin with conserved catalytic machinery. **J. Struct. Biol.**, v. 190, p. 115–21, 2015.

TERRAS, F. R. G. *et al.* Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 15301–15309, 1992.

TERRAS, F. R. G. *et al.* A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. **FEBS Lett.**, v. 316, p. 233–240, 1993.

TERRAS, F. R. G. *et al.* Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2s albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1311–19, 1993.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 437–55, 2004.

TOMAR, P. P. S. *et al.* Purification, characterisation and cloning of a 2S albumin with DNase, RNase and antifungal activities from *Putranjiva roxburghii*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 174, p. 471–482, 2014.

TOMAR, P. P. S. *et al.* Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 448, p. 349–354, 2014.

ULLAH, A. *et al.* Crystal structure of mature 2S albumin from *Moringa oleifera* seeds. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 468, p. 365–71, 2015.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 575–692, 1998.

VERDIER, J.; THOMPSON, R. D. Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling. **Plant Cell Physiol.**, v. 49, p. 1263–71, 2008.

WINKLER, A. J. *et al.* Short-chain chitin oligomers: Promoters of plant growth. **Mar Drugs**, v. 15, p. 1–21, 2017.

YAN, J. *et al.* Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 99, p. 4961–81, 2015.

YANG, X. *et al.* Expression of a novel small antimicrobial protein from the seeds of motherwort (*Leonurus japonicus*) confers disease resistance in tobacco. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 939–46, 2007.

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. **Am. J. Bot.**, v. 68, p. 44–48, 1981.