



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**YARA DE CASTRO SILVA**

**PROTEÍNAS ASSOCIADAS À DEFESA EM PLANTAS DE SOJA**  
**DESAFIADAS COM O FUNGO *Cercospora kikuchii***

**FORTALEZA**

**2017**

YARA DE CASTRO SILVA

PROTEÍNAS ASSOCIADAS À DEFESA EM PLANTAS DE SOJA DESAFIADAS  
COM O FUNGO *Cercospora kikuchii*

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Coorientadora: Msc. Mariana Reis Arantes

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S584p Silva, Yara de Castro.  
Proteínas associadas à defesa em plantas de soja desafiadas com o fungo *Cercospora kikuchii* / Yara de Castro Silva. – 2017.  
81 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.

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

Coorientação: Profa. Ma. Mariana Reis Arantes.

1. Soja. 2. Proteínas de defesa. 3. *Cercospora kikuchii*. I. Título.

CDD 661

---

YARA DE CASTRO SILVA

PROTEÍNAS ASSOCIADAS À DEFESA EM PLANTAS DE SOJA DESAFIADAS  
COM O FUNGO *Cercospora kikuchii*

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Msc. Mariana Reis Arantes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Cléberson de Freitas Fernandes  
Embrapa Agroindústria Tropical

*A Deus.*

*Às minhas avós, Maria do Socorro e Terezinha  
de Jesus.*

*Aos meus amados pais, Andrea e Josivaldo.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Toda honra e toda glória seja dada a Ele. Só tenho a agradecer a Deus por me dar força, saúde e determinação todos os dias para que eu consiga realizar todos os meus sonhos. Agradeço também por Ele saber o melhor para mim e mesmo quando me sinto com medo ou ansiosa lembro que Ele está no controle de tudo e por ter me enchido de pessoas tão especiais ao meu redor.

À minha avó Maria do Socorro por me ensinar sempre e me apoiar nos meus sonhos com todo o amor. À minha avó e minha bisavó, Terezinha de Jesus e Amélia, por todos os ensinamentos e por todo o amor que recebi enquanto não haviam chegado à casa do Pai.

Aos meus amados pais, Andrea e Josivaldo, que sempre fazem de tudo para que eu tenha a melhor educação possível, por apoiarem minhas escolhas e meus sonhos e por estarem sempre dispostos a me ajudar em qualquer que seja a situação. Até mesmo se a situação for ir no fim de semana para a faculdade só para regar minhas plantinhas.

Aos meus irmãos, Gabrielle e Rômmel, por serem exemplos para mim na busca da realização profissional, por estarem sempre buscando melhorar e aprender. Agradeço pelas vezes que precisei de ajuda e sempre estiveram prontos para me ajudar no que fosse preciso.

Agradeço ao Professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira por ter me acolhido tão bem em seu laboratório e por sempre estar disposto a ensinar, ajudar e por ter confiado em meu trabalho na execução desse projeto. Agradeço também à Professora Dra. Ilka Maria Vasconcelos e à Professora Dra. Daniele Bezerra de Oliveira de Sousa, pois tive a honra de também ter as duas como orientadoras durante a minha iniciação científica, muito obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos.

Agradeço à minha co-orientadora linda, Mariana Reis Arantes, por toda paciência em me ensinar, por ter confiado tanto em mim e pela amizade. Sem dúvidas, sem a ajuda e sem os puxões de orelha eu não conseguiria finalizar esse projeto. Só tenho a agradecer! Pode contar comigo quando precisar, só não me chama para fazer atividade quitinásica, já sabe.

Agradeço também a todos os integrantes do Labtox e do LPVD, pois cada um teve um pouco de contribuição nesse trabalho. Obrigada, Lucas Pinheiro, Helen Costa, João Xavier, Tiago Deivison, Paulo Carvalho, Lady Clarissa, Tarcymara Garcia, Marina Gabrielle, Nadine Monteiro, Larissa Alves, Ana Paula, Halisson Sousa, Amanda Moura, Patrícia, Bruno Henrique, Pedro Filho, Thiago Fernandes, Ivna Salmito, Raissa Bret, Queilane Chaves e Dhel Neres pelo carinho e pela paciência, pois aprendi muito com cada um de vocês.

Agradeço ao Dr. Cléberson de Freitas Fernandes por ter aceitado o convite de participar da banca examinadora mesmo em cima da hora e pelas suas contribuições anteriores.

Não podia deixar de agradecer ao Jerônimo Azevedo por ter me dado forças quando eu senti dificuldade, com os melhores conselhos que eu poderia ouvir, e por ter compreendido quando não pude me fazer presente em alguns momentos.

*“Ora, àquele que é poderoso para fazer  
tudo muito mais abundantemente além  
daquilo que pedimos ou pensamos, segundo  
o poder que em nós opera.”*

*(Efésios 3:20)*

## RESUMO

A soja é uma cultura que está em ascensão no Brasil devido ao seu alto valor nutricional e suas diversas aplicações, porém, há grandes perdas em sua produção por conta do ataque de fitopatógenos. *Cercospora kikuchii* é um fungo que está presente em todas as regiões produtoras de soja no Brasil e causa infecções de final de ciclo que geram perdas de 20% no rendimento produtivo. Para combater fitopatógenos, as plantas possuem mecanismos de defesa constitutivos, que já estão presentes na planta, e induzidos, que são ativados por sinais moleculares oriundos do patógeno ou da própria planta, sendo estes reconhecidos pela mesma quando atacada. Dentre os mecanismos induzidos, estão a explosão oxidativa, quando há geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do Inglês, *Reactive Oxygen Species*) em quantidades acima da fisiológica, a resposta hipersensitiva (HR, do Inglês, *Hypersensitive Response*), que leva, eventualmente, à morte celular programada (PCR, do Inglês, *Programmed Cell Death*), a Resposta Sistêmica Adquirida (SAR, do Inglês, *Systemic Acquired Resistance*), e a indução de proteínas de defesa, ou PR-Proteínas (do Inglês, *Pathogenesis Related proteins*). O presente estudo teve como objetivo avaliar respostas bioquímicas associadas às proteínas constitutivas e induzidas em plantas de soja, em diferentes fases de seu ciclo de desenvolvimento, quando desafiadas pelo fungo *C. kikuchii*. Análises comparativas foram conduzidas em extratos proteicos de folhas oriundas tanto de plantas controles, não infectadas, como desafiadas pelo fungo. Examinadas as proteínas constitutivas em plantas controles, na fase jovem, superóxido dismutase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase e proteases apresentaram as mais altas atividades. Na fase adulta, catalase, ascorbato peroxidase, peroxidases de fenóis, fenilalanina amônia-liases e inibidores de proteases predominaram. Em relação às plantas desafiadas com *C. kikuchii*, na fase jovem, houve rápida resposta da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, logo no início da infecção, além de modulação da quantidade de proteases. Já na fase adulta, houve redução da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, mas aumentos de atividade inibitória de proteases, de peroxidases e de fenilalanina amônia-liases. Estes resultados sugerem que o mecanismo de defesa da soja contra o *C. kikuchii*, utilizado na fase jovem, está relacionado ao aumento da atividade de enzimas degradadoras de parede celular de fungos, na atividade proteásica e na indução de respostas sistêmicas. Na fase adulta, é possível que o declínio da atividade glucanásica esteja ligado à deposição de calose, enquanto o aumento concomitante de peroxidases de fenóis e fenilalanina amônia-liases relacionado à lignificação, além do aumento de concentrações de peróxido de hidrogênio. Em suma, este trabalho permitiu verificar a ocorrência de diferentes respostas bioquímicas da soja, em fases distintas de seu



desenvolvimento, quando desafiada pelo *C. kikuchii*. Tal fato pode estar associado ao estabelecimento da relação de incompatibilidade com o fungo na fase jovem e de compatibilidade na fase adulta, quando o patógeno consegue se estabelecer e disseminar na planta.

**Palavras-chave:** Soja, proteínas de defesa, *Cercospora kikuchii*.

## ABSTRACT

Soybean is a crop that has been growing in importance in Brazil due to its high nutritional value and various applications. However, its production is significantly impaired due to phytopathogen attack. The fungus *Cercospora kikuchii* occurs in all soybean producing Brazilian regions and leads to around 20% losses in yield after its attack and establishment in adult plants. To cope with phytopathogens, plants have evolved both constitutive and induced defense mechanisms. Among the mechanisms induced are the oxidative burst, when there is generation of reactive oxygen species (ROS) above the physiological level, hypersensitive response (HR), which leads, eventually, to the programmed cell death (PCD), the Systemic Acquired Resistance (SAR), and the induction of defense proteins, or PR-Proteins (Pathogenesis Related proteins). The present study aimed to evaluate the biochemical responses associated with constitutive and induced proteins of soybean plants, at different stages of their development cycle, when challenged by *C. kikuchii*. Comparative analyzes were conducted on protein extracts from leaves from both control (uninfected) and plants challenged with the fungus. Examining the constitutive proteins in young plants, superoxide dismutase, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and proteases exhibited the highest activities. In the adult phase, catalase, ascorbate peroxidase, phenol peroxidase, phenylalanine ammonia-lyases and protease inhibitors predominated. In relation to the plants challenged with *C. kikuchii*, in the young phase, there was a rapid response of  $\beta$ -1,3-glucanase activity at the early stage of infection, as well as a possible accumulation of hydrogen peroxide and modulation of the amount of proteases. In the adult phase, there was a decrease in  $\beta$ -1,3-glucanase activity, but increases in the inhibitory activity of proteases, peroxidases and phenylalanine ammonia-lyases. These results suggest that the soybean defense mechanism used in the young phase against *C. kikuchii* is related to the increases of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activity and SAR induction. In adult plants, it is possible that the decline of glucanase activity is related to callose deposition, while the concomitant increase of phenol peroxidases and phenylalanine ammonia-lyases is related to lignification. In short, this work allowed verifying the occurrence of different biochemical responses of soybean, at different developmental stages, when it was challenged by *C. kikuchii*. This fact might be associated to the establishment of the incompatible relationship of soybean with the fungus in the young phase and compatibility in the adult phase, when the pathogen can establish and disseminate.

**Keywords:** Soybean, defense proteins, *Cercospora kikuchii*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Doenças da soja em relação ao seu estágio de desenvolvimento.....	22
Figura 2	Plantas representativas de soja em diferentes estágios de desenvolvimento.....	41
Figura 3	Teor de proteína dos extratos das folhas de plantas jovens (V <sub>2</sub> ) e adultas (R <sub>5</sub> ) de soja.....	42
Figura 4	Perfis de distribuição de proteínas de folhas de plantas jovens e adultas de soja, em relação à massa molecular, após PAGE-SDS (12,5%, m/v) .....	43
Figura 5	Atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo em folhas de plantas jovens e adultas de soja.....	44
Figura 6	Atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas de plantas jovens e adultas de soja.....	45
Figura 7	Atividade quitinásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja.....	46
Figura 8	Atividade $\beta$ -1,3-glucanásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja.....	47
Figura 9	Atividade proteolítica em folhas de plantas jovens e adultas de soja.....	48
Figura 10	Atividade inibitória de proteases em folhas de plantas jovens e adultas de soja.....	49
Figura 11	Teores de proteínas dos extratos de folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	51
Figura 12	Perfis de distribuição de proteínas de folhas de plantas jovens de soja, controles e inoculadas com <i>C. kikuchii</i> , em relação à massa molecular, após PAGE-SDS (12,5%, m/v).....	52
Figura 13	Perfis de distribuição de proteínas de folhas de plantas adultas de soja, controles e inoculadas com <i>C. kikuchii</i> em relação à massa molecular, após PAGE-SDS (12,5%, m/v).....	53
Figura 14	Atividade da SOD em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	55
Figura 15	Atividade catalásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	57
Figura 16	Atividade da APX em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	59
Figura 17	Atividade da POX em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	61

Figura 18	Atividade da PAL em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	63
Figura 19	Atividade quitinásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	65
Figura 20	Atividade glucanásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	67
Figura 21	Atividade proteásica em folhas de plantas jovens de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	69
Figura 22	Atividade de inibidores de proteases em folhas de plantas adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do leite de vaca e do extrato solúvel de soja, ambos em pó.....	19
Tabela 2	Comparativo de área, produtividade e produção da Soja no Brasil.....	20
Tabela 3	Família de proteínas relacionadas à patogênese.....	24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1. Soja.....	18
2.1.1. Importância da soja.....	18
2.1.2. Perdas no cultivo da soja.....	20
2.1.3. Danos causados por fungos.....	21
2.1.4. <i>Cercospora kikuchii</i> .....	22
2.2. Mecanismos de defesa em plantas.....	23
2.3. Proteínas de defesa.....	23
2.3.1. Peroxidases.....	24
2.3.2. Quitinases.....	25
2.3.3. $\beta$ -1,3-glucanases.....	25
2.3.4. Superóxido dismutases (SOD).....	26
2.3.5. Fenilalanina amônia-liase (PAL).....	26
2.3.6. Proteases.....	27
2.3.7. Inibidores de proteases.....	28
<b>3. PERGUNTAS DE PARTIDA.....</b>	<b>29</b>
<b>4. HIPÓTESE.....</b>	<b>30</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
5.1. Objetivo geral .....	31
5.2. Objetivos específicos.....	31
<b>6. METODOLOGIA .....</b>	<b>32</b>
6.1. Sementes de soja .....	32
6.2. Fungo .....	32
6.3. Plantio.....	32
6.4. Extração de proteínas.....	33
6.5. Quantificação de proteínas.....	33
6.6. Eletroforese (SDS-PAGE) .....	33
6.7. Obtenção de suspensão de micélios do fungo <i>C. kikuchii</i> .....	33
6.8. Inoculação com a suspensão de micélios de <i>C. kikuchii</i> e coleta das folhas.....	34
6.9. Detecção de proteínas envolvidas na defesa vegetal.....	34

6.9.1. Detecção de superóxido dismutase (SOD).....	34
6.9.2. Detecção de catalase (CAT).....	35
6.9.3. Detecção de peroxidase ascorbato dependente (APX).....	35
6.9.4. Detecção de peroxidase guaiacol dependente (POX).....	35
6.9.5. Detecção de fenilalanina amônia-liase (PAL).....	36
6.9.6. Detecção de quitinase (CHI).....	36
6.9.7. Detecção de proteases.....	37
6.9.8. Detecção de inibidores de proteases serínicas.....	38
6.9.9. Detecção de inibidores de proteases cisteínicas.....	38
6.9.10. Detecção de $\beta$ -1,3-glucanase.....	39
6.10. Análise Estatística.....	40
<b>7. RESULTADOS</b> .....	41
7.1. Desenvolvimento e teor de proteína de plantas jovens (V <sub>2</sub> ) e adultas (R <sub>5</sub> ).....	41
7.2. Atividades associadas às proteínas de defesa em folhas de plantas jovens e adultas de soja.....	44
7.2.1. Atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo.....	44
7.2.2. Atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL).....	45
7.2.3. Atividade quitinásica.....	46
7.2.4. Atividade da $\beta$ -1,3-glucanase.....	47
7.2.5. Atividade proteolítica.....	48
7.2.6. Atividade de inibidores de proteases.....	49
7.3. Desenvolvimento e teores de proteínas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com <i>C. kikuchii</i> .....	50
7.4. Atividade de proteínas associadas à defesa .....	54
7.4.1. Atividade de SOD.....	54
7.4.2. Atividade de catalásica.....	56
7.4.3. Atividade da APX.....	58
7.4.4. Atividade da POX.....	60
7.4.5. Atividade da PAL.....	62
7.4.6. Atividade quitinásica.....	64
7.4.7. Atividade glucanásica.....	66
7.4.8. Atividade proteásica.....	68
7.4.9. Atividade de inibidores de proteases.....	70

<b>8. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>9. CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>10. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A soja se tornou uma das principais monoculturas mundiais, sustentada por diferentes usos, como a produção de carnes, elaboração de bebidas à base de soja, fabricação de óleos alimentícios e geração de biocombustíveis. Diante de tantas utilidades, essa leguminosa é considerada a de maior importância econômica, além de ser a principal oleaginosa produzida e consumida, sendo o Brasil o segundo maior produtor no cenário mundial (BALBINOT JUNIOR *et al.*, 2017).

Porém, existem alguns fatores que afetam a produção de grãos, dentre eles os estresses bióticos e abióticos. As doenças causadas por fitopatógenos estão entre os fatores que diminuem a produtividade da soja. Os principais causadores dessas doenças são os fungos fitopatogênicos. As infecções fúngicas que ocasionam maiores perdas na produção são aquelas de final de ciclo, pois os sintomas se apresentam mais severos e ocasionam perdas drásticas na produção de grãos (SUZUKI; YUYAMA; CAMACHO, 2006; BARROS, 2011).

O *Cercospora kikuchii* é um fungo que infecta a soja no seu período de final de ciclo, ocasionando crestamento foliar e mancha púrpura na semente. Assim, esse fungo é um grande responsável pela queda na produção de soja e pela desvalorização de sementes por perda de qualidade. A manifestação dos sintomas está relacionada com a síntese de uma toxina produzida pelo *C. kikuchii*, a cercosporina, um metabólito secundário que se é mais detectado em folhas na fase adulta de desenvolvimento (CHANDA *et al.*, 2014). Esta toxina interage com macromoléculas vegetais causando danos à membrana celular do hospedeiro, promovendo a peroxidação de lipídeos, perda de eletrólitos e formação de espécies reativas de oxigênio na presença de luz (CARREGAL; WEGENER; SILVA, 2015; DAUB; BRIGGS, 1983).

Para combater estas infecções, a planta possui uma série de estratégias relacionadas à defesa contra patógenos, dentre elas a produção de espécies reativas de oxigênio, a resposta hipersensitiva (HR), a resistência sistêmica adquirida (SAR), a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e síntese de compostos sinalizadores de respostas de defesa, como ácido salicílico e peróxido de hidrogênio (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). O mecanismo de defesa pode ser tanto constitutivo, o qual já está presente nas plantas, quanto induzido, o qual é iniciado a partir do reconhecimento do fitopatógeno pela planta, culminando na ativação das barreiras químicas e físicas de proteção (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

Diante das informações citadas, surgiu a hipótese de que em plantas de soja, na fase jovem, as quantidades basais de proteínas de defesa estariam em quantidade suficientes para proteger

a planta e impedir o desenvolvimento da doença. Diante disso, o presente estudo foi proposto com o intuito de responder ao seguinte questionamento:

- Quais proteínas de defesa estariam envolvidas nas estratégias de combate ao *C. kikuchii*?

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Soja

#### 2.1.1 Importância da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é classificada como pertencente à família Leguminosae, classe Dicotyledoneae, subclasse Archichylamydae e ordem Rosales (DONG *et al.*, 2004). Os avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo, suas aplicações tanto na indústria de alimentos quanto na indústria química e do seu uso como fonte de biocombustíveis evidenciam a importância dessa cultura (FREITAS, 2011). Está entre as espécies produtoras de grãos de maior importância socioeconômica devido a sua rica composição nutricional e aos benefícios que fornece para a saúde como um alimento funcional (PENHA *et al.*, 2007). Os grãos de soja são constituídos de 30 a 42% de proteínas, 30% de carboidratos e 18 a 20% de óleo (PARK *et al.*, 2002). Por conta do seu elevado valor proteico, mostra-se como uma grande substituta da carne na alimentação em dietas vegetarianas além de sua composição química mostrar-se superior a outros produtos de origem vegetal e equivalente a alimentos de origem animal (CÂMARA, 2011) (TABELA 1).

Tabela 1 - Composição química do leite de vaca e do extrato solúvel de soja, ambos em pó

Composição	Extrato de soja	Leite de vaca
Calorias (kcal)	429,0	450,5
Carboidratos (%)	28,0	35,1
Proteínas (%)	41,8	28,7
Lipídios (%)	20,3	21,7
Ca (mg/g)	275	909
P (mg/g)	674	708
Fe (mg/g)	5,0	0,5
Retinol (vit. A) (µg/100 g)	4	270
Tiamina (vit. B1) (µg/100 g)	300	290
Rioboflavina (vit. B2) (µg/100 g)	250	1460
Niacina (mg/100 g)	0,400	0,700
Ácido ascórbico (vit. C) (mg/100 g)	0,0	6,0

Fonte: Franco (1986).

Quanto à sua produtividade, a soja enquadra-se como uma cultura em expansão no Brasil, o segundo maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos (CONAB, 2017). Segundo o levantamento da safra brasileira de grãos 2016/17, divulgado em setembro pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), as colheitas alcançaram a produção de 114.095,8 mil toneladas em 33.251,9 milhões de hectares cultivados. Na safra 2017/18 a soja pode vir a bater um novo recorde de produção no Brasil, com um crescimento de 2% no percentual de área plantada em relação à safra anterior atingindo uma área de, aproximadamente, 33.903,4 mil hectares, com mais de 100 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2017) (TABELA 2).

Tabela 2 - Comparativo de área, produtividade e produção da Soja no Brasil

REGIÃO/UF	ÁREA (Em mil ha)			PRODUTIVIDADE (Em kg/ha)			PRODUÇÃO (Em mil t)		
	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR %	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR. %	Safra 15/16	Safra 16/17	VAR %
	(a)	(b)	(b/a)	(c)	(d)	(d/c)	(e)	(f)	(f/e)
<b>NORTE</b>	<b>1.576,3</b>	<b>1.809,0</b>	<b>14,8</b>	<b>2.423</b>	<b>3.061</b>	<b>26,3</b>	<b>3.818,9</b>	<b>5.536,4</b>	<b>45,0</b>
RR	24,0	30,0	25,0	3.300	3.000	(9,1)	79,2	90,0	13,6
RO	252,6	296,0	17,2	3.028	3.143	3,8	765,0	930,3	21,6
AP	-	18,9	-	-	2.878	-	-	54,4	-
PA	428,9	500,1	16,6	3.003	3.270	8,9	1.288,0	1.635,3	27,0
TO	870,8	964,0	10,7	1.937	2.932	51,4	1.686,7	2.826,4	67,6
<b>NORDESTE</b>	<b>2.878,2</b>	<b>3.095,8</b>	<b>7,6</b>	<b>1.774</b>	<b>3.115</b>	<b>75,6</b>	<b>5.107,1</b>	<b>9.644,7</b>	<b>88,8</b>
MA	786,3	821,7	4,5	1.590	3.010	89,3	1.250,2	2.473,3	97,8
PI	565,0	693,8	22,8	1.143	2.952	158,3	645,8	2.048,1	217,1
BA	1.526,9	1.580,3	3,5	2.103	3.242	54,2	3.211,1	5.123,3	59,5
<b>CENTRO-OESTE</b>	<b>14.925,1</b>	<b>15.193,6</b>	<b>1,8</b>	<b>2.931</b>	<b>3.301</b>	<b>12,6</b>	<b>43.752,6</b>	<b>50.149,9</b>	<b>14,6</b>
MT	9.140,0	9.322,8	2,0	2.848	3.273	14,9	26.030,7	30.513,5	17,2
MS	2.430,0	2.522,3	3,8	2.980	3.400	14,1	7.241,4	8.575,8	18,4
GO	3.285,1	3.278,5	(0,2)	3.120	3.300	5,8	10.249,5	10.819,1	5,6
DF	70,0	70,0	-	3.300	3.450	4,5	231,0	241,5	4,5
<b>SUDESTE</b>	<b>2.326,9</b>	<b>2.351,4</b>	<b>1,1</b>	<b>3.255</b>	<b>3.467</b>	<b>6,5</b>	<b>7.574,9</b>	<b>8.151,5</b>	<b>7,6</b>
MG	1.469,3	1.456,1	(0,9)	3.220	3.480	8,1	4.731,1	5.067,2	7,1
SP	857,6	895,3	4,4	3.316	3.445	3,9	2.843,8	3.084,3	8,5
<b>SUL</b>	<b>11.545,4</b>	<b>11.459,6</b>	<b>(0,7)</b>	<b>3.047</b>	<b>3.542</b>	<b>16,2</b>	<b>35.181,1</b>	<b>40.592,8</b>	<b>15,4</b>
PR	5.451,3	5.249,6	(3,7)	3.090	3.731	20,7	16.844,5	19.586,3	16,3
SC	639,1	640,4	0,2	3.341	3.580	7,2	2.135,2	2.292,6	7,4
RS	5.455,0	5.569,6	2,1	2.970	3.360	13,1	16.201,4	18.713,9	15,5
<b>NORTE/NORDESTE</b>	<b>4.454,5</b>	<b>4.904,8</b>	<b>10,1</b>	<b>2.004</b>	<b>3.095</b>	<b>54,5</b>	<b>8.926,0</b>	<b>15.181,1</b>	<b>70,1</b>
<b>CENTRO-SUL</b>	<b>28.797,4</b>	<b>29.004,6</b>	<b>0,7</b>	<b>3.004</b>	<b>3.410</b>	<b>13,5</b>	<b>86.508,6</b>	<b>98.894,2</b>	<b>14,3</b>
<b>BRASIL</b>	<b>33.251,9</b>	<b>33.909,4</b>	<b>2,0</b>	<b>2.870</b>	<b>3.364</b>	<b>17,2</b>	<b>95.434,6</b>	<b>114.075,3</b>	<b>19,5</b>

Fonte: Conab (2017).

### 2.1.2 Perdas no cultivo da soja

Os principais fatores que limitam a produtividade da soja são classificados em dois grupos: estresses bióticos e abióticos. Os bióticos consistem em organismos (bactérias, insetos, fungos etc.) que podem agir na cultura de modo a influenciar maleficamente ou benéficamente.

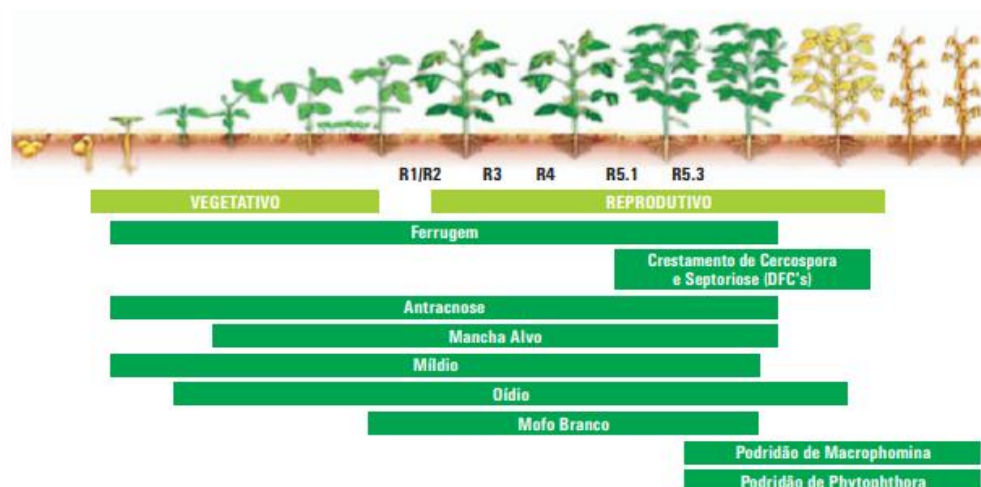
Já os fatores ambientais, que não são causados por seres vivos, são enquadrados como abióticos, dentre eles os aspectos físicos, químicos e físico-químicos do ambiente, como inadequação de aporte de nutrientes, clima, umidade, intensidade de luz solar e salinidade excessiva. Entretanto, os principais fatores ambientais que determinam o rendimento máximo da produção da soja são temperatura, radiação solar e água, embora outros também estejam relacionados. Os estresses abióticos reduzem, em média, de 10 a 20% da produtividade das culturas (BRAY, 2004).

As doenças estão dentre os fatores que diminuem a produtividade da soja mais importantes e difíceis de controlar. As práticas inadequadas de manejo, além do sistema de monocultura e expansão para cultivo em novas áreas, contribuem para o aumento de doenças fitopatológicas causadas por bactérias, vírus, fungos e nematoides (SUZUKI; YUYAMA; CAMACHO, 2006).

### ***2.1.3. Danos causados por fungos***

Existem diversas espécies de fungos fitopatogênicos que afetam diretamente a sojicultura. As doenças causadas por estes fungos são agrupadas pelas diferentes estruturas vegetais que eles atacam: sementes, plântulas, raízes, hastes, colos e folhas. Existem diversas espécies de fungos fitopatogênicos que afetam diretamente a sojicultura. As infecções mais importantes para sua economia são aquelas que afetam a planta em seu final de ciclo, quando os sintomas se apresentam mais severos a partir da fase final de enchimento dos grãos, refletindo de forma significativa na sua produtividade. As doenças de final de ciclo mais importantes na sojicultura são a septoriose (*Septoria glycines*) e o crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*) (BARROS, 2011) (FIGURA 1). Estas duas doenças estão presentes em todas as regiões produtoras de soja do Brasil, podendo ocasionar maiores danos nas regiões de climas mais quentes e chuvosos, principalmente no cerrado. Em condições que favorecem o seu desenvolvimento, estas doenças podem causar perdas de mais de 20%, equivalendo a um prejuízo anual de cerca de 20.000.000 toneladas de soja (CONAB, 2017; EMBRAPA, 2014).

Figura 1 - Doenças da soja em relação ao seu estágio de desenvolvimento



Fonte: Barros (2011).

#### 2.1.4. *Cercospora kikuchii*

O fitopatógeno *C. kikuchii* é um fungo necrotrófico e causador das doenças crestamento foliar e mancha púrpura da semente, sendo responsável por grandes reduções na produtividade da soja, visto que ataca todos os tecidos da planta (CARREGAL; WEGENER; SILVA, 2015).

A manifestação da doença é causada pela produção de um metabólito secundário produzido pelo fungo, a cercosporina, que possui capacidade de interagir com macromoléculas vegetais causando danos à membrana celular do hospedeiro, promovendo a peroxidação de lipídeos, perda de eletrólitos e formação de espécies reativas de oxigênio em presença de luz. Essa toxina é um fator de virulência que aumenta, significativamente, a quantidade e gravidade da doença (DAUB; BRIGGS, 1983). Em um estudo realizado utilizando extratos aquosos de folhas de soja como substrato de meio de cultura, foi observado que o fungo *C. kikuchii* sintetizou maiores quantidades de cercosporina no meio suplementado com extratos de plantas adultas. Esses dados indicam que nesta fase de desenvolvimento a planta é mais suscetível à doença (EHRENSHAFT; UPCHURCH, 1993). Alguns dos seus sintomas são o crestamento foliar, desfolhamento prematuro, aparecimento de coloração arroxeada nas sementes, redução da taxa de germinação e da qualidade dos grãos (CARREGAL; WEGENER; SILVA, 2015). Esses sintomas são mais evidentes quando a planta se encontra em sua fase adulta (WALTERS, 1980).

O desenvolvimento da doença é favorecido pelas altas temperaturas e umidade e, também, pelo tipo de solo no qual a planta está sendo cultivada, visto que solos de baixa fertilidade propiciam ataques mais severos de fungos fitopatogênicos (RODRIGUES, 2009).

## 2.2. Mecanismos de defesa em plantas

O mecanismo de defesa vegetal está relacionado com a idade e grau nutricional da planta hospedeira, bem como com as condições ambientais nas quais está inserida (STANGARLIN *et al.*, 2011). A fim de combater os patógenos, as plantas possuem uma resistência natural, baseada em moléculas relacionadas a sua defesa. Dentre as defesas utilizadas pelas plantas estão a produção de espécies reativas de oxigênio, especialmente o superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ), além da resposta hipersensitiva (HR) e da morte celular programada (HELLER; TUDZYNSKI, 2011). Outros mecanismos de defesa são a resistência sistêmica adquirida (SAR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) e a síntese de compostos sinalizadores de respostas de defesa, como por exemplo, ácido salicílico (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de sucessivos sinais e eventos que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina na ativação das barreiras físicas e bioquímicas envolvidas no processo de defesa (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

As barreiras físicas compreendem os mecanismos estruturais que interferem na penetração e na colonização do patógeno na planta. Dentre as barreiras físicas encontram-se as ceras e as cutículas que recobrem as células epidérmicas e tricomas. As barreiras químicas são os mecanismos bioquímicos que envolvem as moléculas relacionadas à inibição do desenvolvimento do patógeno ou ainda que geram condições adversas para a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro. (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

Nos mecanismos bioquímicos de defesa constitutivos, ou pré-formados, as substâncias já estão presentes na planta naturalmente. Por outro lado, nos mecanismos pós-formados, ou induzidos, as substâncias encontram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo ativadas em resposta à presença do patógeno (STANGARLIN *et al.*, 2011).

## 2.3. Proteínas de defesa

As proteínas de defesa podem participar direta ou indiretamente na defesa da planta contra estresses abióticos ou bióticos, alterando seu perfil de atividade. Além das proteínas

relacionadas à patogênese, existem outras proteínas que estão envolvidas na defesa vegetal seja de forma direta ou indireta, dentre elas: superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia-liases (PAL) e proteases.

As proteínas relacionadas à patogênese são induzidas por infecções por agentes patogênicos como fungos, bactérias e insetos ou por estresses abióticos. Essas proteínas conferem resistência local e sistêmica em resposta aos ataques de patógenos, após o reconhecimento dos elicitores por receptores da planta (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Atualmente são conhecidas 17 famílias de PRPs em vegetais (TABELA 3), com as mais diferenciadas funções e, em cada família, incluem-se classes com diferentes isoformas, respectivamente ácidas ou básicas (GORJANOVIĆ, 2009).

Tabela 3 - Família de proteínas relacionadas à patogênese

<b>Família</b>	<b>Propriedades</b>
PR-1	Antifúngica
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase
PR-3	Quitinase I-II, IV-VII
PR-4	Quitinase I-II
PR-5	Osmotina
PR-6	Inibidores de protease
PR-7	Endoproteinases
PR-8	Quitinase III
PR-9	Peroxidases
PR-10	<i>Proteínas semelhantes a ribonuclease</i>
PR-11	Quitinase V
PR-12	Defensinas
PR-13	Tioninas
PR-14	Proteínas relacionadas com o transporte de lipídios
PR-15	Oxalato oxidases
PR-16	<i>Proteínas semelhantes a oxalato oxidase</i>
PR-17	Desconhecida

Fonte: Stangarlin *et al.* (2011).

A seguir, algumas características das proteínas envolvidas na defesa vegetal contra fungos são apresentadas.

### **2.3.1 Peroxidases**

As enzimas peroxidases estão presentes nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos e são conhecidas por participarem de vários processos



fisiológicos de grande importância. Essas enzimas catalisam a oxirredução entre moléculas de peróxido de hidrogênio e diversos substratos orgânicos e inorgânicos (HIRAGA *et al.*, 2001). As peroxidases participam da oxidação de compostos fenólicos, que se acumulam em resposta à infecção (FRY, 1986).

Devido à similaridade existente nas sequências de aminoácidos de diversas proteínas, as peroxidases foram divididas em três classes: classe I, referente às proteínas intracelulares, que inclui peroxidases dependente de ascorbato, catalase, dentre outras; classe II, incluindo as peroxidases de lignina extracelular e as fúngicas dependentes de manganês (Mn); classe III, onde estão alocadas principalmente as peroxidases extracelulares, incluindo as peroxidases dependentes de guaiacol (HIRAGA *et al.*, 2001).

Alguns estudos indicam a ação direta da peroxidase contra fungos, dentre eles aquele realizado com uma peroxidase purificada do látex de *Marsdenia megalantha*, por nosso grupo de pesquisa, que retardou e inibiu a germinação de conídios de *Fusarium oxysporium* e *F. solani* (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

### 2.3.2. *Quitinases*

As quitinases estão amplamente distribuídas na natureza. Estas enzimas são responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas da quitina, além de possuir outras funções como de defesa contra fitopatógenos (UBHAYASEKERA, 2011).

Em ação contra fungos filamentosos, podem quebrar a quitina presente na parede celular desprotegendo a membrana plasmática, que pode, eventualmente, se romper, causando morte do microrganismo. Por exemplo, uma quitinase recombinante de arroz expressa em *Pichia pastoris* inibiu a germinação de esporos e o crescimento micelial de *Penicillium herquei*, após interação da enzima com a parede celular do fungo (LANDIM *et al.*, 2017).

### 2.3.3 $\beta$ -1,3-glucanases

As  $\beta$ -1-3-glucanases (GLUs) são enzimas que promovem a clivagem endo-hidrolítica de ligações  $\beta$ -1,3-glicosídicas em  $\beta$ -1,3-glucanos. As GLUs das plantas, além do envolvimento na defesa, desempenham várias funções fisiológicas e processos de desenvolvimento, como divisão celular, microsporogênese, germinação de pólen, crescimento de tubos, fertilização, embriogênese, amadurecimento de frutos, germinação de sementes, mobilização de reservas de armazenamento e dormência de brotos (LEUBNER-METZGER; MEINS, 1999).

Para defender a planta do ataque de fungos, as  $\beta$ -1-3-glucanases desempenham o papel de degradar a parede celular desses patógenos, visto que seu componente predominante são os  $\beta$ -1,3-glucanos. Diferentes genótipos de *Xanthosoma sagittifolium* (taioba ou orelha-de-elefante) foram inoculados com *Pythium myriotylu* para caracterização de suas respostas de defesa. Significante aumento na atividade de  $\beta$ -1-3-glucanases e de quitinases nas raízes da cultivar resistente foi observado quando comparado com os genótipos susceptíveis, sugerindo que a resistência está associada ao aumento dessas proteínas de defesa, mostrando o potencial de  $\beta$ -1-3-glucanases na defesa contra fungos fitopatogênicos (NYOCHEMBENG; BEYL, 2015).

#### **2.3.4 Superóxido dismutases (SODs)**

São enzimas que catalisam a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. No mecanismo de defesa de plantas, as SODs podem atuar no sistema de defesa antioxidante conferindo tolerância a estresse oxidativo causado por organismos patogênicos (FAIZE *et al.*, 2012). Representam, portanto, uma das mais importantes defesas antioxidantes enzimáticas existentes em praticamente todas as células expostas ao oxigênio, visto que as espécies reativas de oxigênio podem provocar danos nas células, ou em proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas importantes (MILLER, 2012).

Existem três tipos principais de superóxido dismutases, segundo classificação de acordo com o seu cofator enzimático. As Cu-Zn SOD (SOD de cobre e zinco) estão presentes no citosol, no espaço extracelular, nos cloroplastos e nas membranas dos tilacoides. Já as Mn SOD (SOD de manganês) estão localizadas nas mitocôndrias e nos peroxissomas das células eucariotas (MILLER, 2012). Enquanto as Fe SOD (SOD de ferro) se encontram nos cloroplastos das células vegetais (FOYER; NOCTOR, 2005).

Folhas de *Vigna unguiculata* de um genótipo resistente infectadas pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum gloeosporioides* mostraram maior atividade de SOD comparadas com àquelas de um genótipo suscetível, além de apresentarem resposta mais rápida ao ataque do fitopatógeno, impedido sua proliferação e estabelecimento de doença nas plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

#### **2.3.5 Fenilalanina amônia-liase (PAL)**

A fenilalanina amônia-liase é detectada nos tecidos de fungos, de algas e, principalmente, de plantas superiores. São enzimas do metabolismo secundário mais

intensivamente estudadas em plantas, devido à sua importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008). Elas são responsáveis pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), que estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas, dentre outros compostos (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008). Portanto, a inibição ou redução da atividade da PAL irá afetar, diretamente, a biossíntese de diversos compostos fenólicos essenciais para a defesa da planta (CHAMAN; COPAJA; ARGANDONA, 2003). Em espécies de plantas do gênero *Brachypodium*, que tiveram os genes responsáveis pela síntese da fenilalanina amônia-liase nocauteados, redução de mais de 40% da quantidade total de lignina foi observada, o que acarretou em aumento na susceptibilidade aos fungos *F. culmorum* e *M. oryzae* (CASS *et al.*, 2015). Isso ocorreu, porque a PAL atua na formação dos precursores da lignina, que são sintetizados pela rota metabólica do ácido trans-cinâmico (RAES *et al.*, 2003).

### 2.3.6 *Proteases*

São enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, ou seja, possuem atividade proteolítica. A atividade proteolítica é essencial para o desenvolvimento de muitos processos celulares (TREMACOLDI, 2008). As proteases podem ser classificadas com base em seus resíduos catalíticos do sítio ativo. Proteases aspárticas catalisam a hidrólise através de uma cadeia lateral de resíduos de ácido aspártico em complexo com uma molécula de água. Já as metalo-proteases contém um cátion metálico, por exemplo, o zinco, que se complexa com uma molécula de água, tornando-a nucleofílica suficiente para realizar a hidrólise. As proteases serínicas catalisam a hidrólise através da reação da fração hidroxil da cadeia lateral da serina com o substrato carbonil. Enquanto a treonina e tirosina reagem de forma semelhante às proteases serínicas. Por fim, as proteases cisteínicas catalisam a hidrólise da ligação peptídica através da reação nucleofílica do tiol da cisteína com o substrato carbonil (BRIDGES, 2008).

Em um estudo realizado com uma protease cisteínica isolada do látex de *Cryptostegia grandiflora* houve inibição completa da germinação de esporos do fungo *Fusarium solani* quando estes foram postos em contato com o fungo (RAMOS *et al.*, 2014). Ainda, evidências do papel das proteases cisteínicas no desenvolvimento da resposta hipersensitiva contra fungos foram relatadas por D'Silva, Poirier e Heath (1998). Eles detectaram um inibidor de proteases cisteínicas capaz de impedir a resposta hipersensitiva em *Vigna unguiculata* contra o fungo causador de ferrugem.

### 2.3.7 Inibidores de proteases

São proteínas capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas modificando o seu sítio ativo e, então, promovendo inibição da ação dessas proteases (NEURATH, 1990). Podem atuar como agentes regulatórios no controle endógeno de proteases, como proteínas de reserva e como mecanismo de proteção direta contra proteases de insetos e de microrganismos patogênicos (KAPUR; TAN-WILSON; WILSON, 1989).

Os inibidores de proteases podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação das enzimas que eles inibem. Dessa forma, as classes de inibidores de proteases conhecidas são: Inibidores de proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas, metalo-proteinases e treonina proteases (FAN; WU, 2005).

A ação destes inibidores na defesa da planta pode estar associada à inibição da proteólise das enzimas do patógeno e consequente redução de aporte de aminoácidos provenientes das proteínas do meio de cultura, necessários para o desenvolvimento do microrganismo (SHARMA, 2015). Por exemplo, o inibidor de tripsina proveniente de torta de sementes de mamona inibiu a germinação de esporos do *Colletotrichum gloeosporioides* (SILVA *et al.*, 2015).

### 3. PERGUNTAS DE PARTIDA

- Que proteínas poderiam estar envolvidas com a defesa da soja nas fases precoces de seu crescimento?
- Há, de fato, diferenças significativas de teores de proteínas de defesa na soja comparando plantas jovens com adultas?
- Será, que, na fase jovem, há indução de SAR quando a planta é desafiada com *C. kikuchii*?
- Com quais funções estas proteínas estariam envolvidas na planta?

#### 4. HIPÓTESE

Com base em informações de estudos preliminares, sabe-se que o estágio de desenvolvimento da soja é crucial para o estabelecimento da doença causada pelo fungo *C. kikuchii*. Na fase jovem, o fungo não consegue se estabelecer, mas sim na fase adulta. Então, na fase jovem, a planta se defende deste fungo porque dispõe de proteínas específicas, em quantidades suficientes para evitar a proliferação do fungo e estabelecimento da doença, ao contrário das plantas adultas. Além disso, a indução de proteínas em plantas jovens confere uma estratégia de defesa que as tornam mais tolerantes ao fungo em questão.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo Geral**

Avaliar proteínas e suas funções envolvidas com a resistência de plantas jovens ao ataque de *C. kikuchii*.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a presença constitutiva e induzida de proteínas de defesa vegetal em folhas de plantas de soja jovens e adultas inoculadas e não-inoculadas com *C. kikuchii*;
- Avaliar se há indução de SAR em plantas de soja jovens e adultas inoculadas com *C. kikuchii*.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. Sementes de soja

Sementes de soja (cultivar BRS-Pala) não tratadas com fungicida foram obtidas na Embrapa - Fundação Pró-sementes (Passo Fundo - RS). As sementes de BRS-Pala apresentam como características resistência às doenças cancro da haste, mancha do olho-de-rã, mosaico comum, oídio, podridão parda da haste, podridão radicular de fitoftora e pústula bacteriana e ao acamamento. Além disso, esta cultivar apresenta um teor proteico de 38,8%, um ciclo semitardio e desenvolvimento determinado (EMBRAPA, 2012). O hábito de crescimento determinado caracteriza-se pela finalização do crescimento vegetativo a partir do início do florescimento. Não existem estudos acerca de sua resistência contra o fungo *Cercospora kikuchii*.

### 6.2. Fungo

O fungo *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner (GARDNER 1925; MATSUMOTO & TOMOYASU 1925) foi obtido na Embrapa - Soja (Londrina - PR). O fungo foi mantido em meio de cultura Agar-tomate, em condições estéreis e apropriadas para o crescimento do microrganismo.

### 6.3. Plantio

Sementes de BRS-Pala foram germinadas em vasos plásticos de 1,0 L contendo areia autoclavada duas vezes a 121 °C,  $1,5 \times 10^5$  Pa por 30 min cada lavagem. Na primeira semana de germinação, os vasos foram regados com água destilada. Após 7 dias, com o surgimento das plântulas, estas foram regadas com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950). Esta solução foi usada a 25%, 50% e 75% de concentração, em relação à solução original não diluída (100%), cada uma por 3 dias, seguida da aplicação da solução 100%, durante todo o restante do período experimental. Foram coletados os primeiros e segundos trifólios de cada planta, tanto na fase jovem (estádio V<sub>2</sub>) quanto na fase adulta (estádio R<sub>5</sub>). O estágio V<sub>2</sub> é descrito como período vegetativo da soja onde há a primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida. Já o estágio R<sub>2</sub> é caracterizado como período reprodutivo da soja em que se inicia o enchimento dos grãos.



#### 6.4. Extração de proteínas

Para obtenção do extrato total das folhas coletadas, as folhas foram maceradas utilizando nitrogênio líquido e o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M, na proporção de 1:3 (m/v), com auxílio de almofariz e pistilo. A mistura obtida foi, então, agitada durante 4 h (4°C) e, em seguida, centrifugada a 12.000 x g, 30 min, 4 °C. O sobrenadante obtido foi dialisado contra o respectivo tampão, na proporção de 1:20 (v/v). As trocas foram realizadas quatro vezes ao dia durante três dias, então obteve-se o extrato total.

#### 6.5. Quantificação de proteínas

O método desenvolvido por Bradford (1976) foi utilizado para quantificação de proteínas presentes nos extratos das folhas. Este ensaio foi conduzido em triplicata, utilizando 100 uL da amostra e adicionando 2500 uL do reagente de Bradford. As leituras das absorbâncias (A) foram feitas e a concentração estimada usando a equação abaixo e um fator (F) obtido pelo cálculo da cotangente da curva padrão [absorbância (A) versus concentração] construída usando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão:

$$\frac{A(\text{média}) \times \text{diluição} \times F}{100} = \text{mg/ml}$$

#### 6.6. Eletroforese (SDS-PAGE)

Para avaliação da diversidade de proteínas presentes nos extratos proteicos das folhas de soja, eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas (LAEMMLI, 1970). Após aplicação das amostras, os géis foram submetidos a uma corrente de 20 mA, durante 1 h. Ao fim da corrida, os géis foram submersos em solução de ácido fosfórico (5%, v/v) por, no mínimo, 40 min, sendo as bandas proteicas visualizadas e analisadas após revelação com Comassie Coloidal (NEUHOFF *et al.*, 1988).

#### 6.7. Obtenção da suspensão de micélios do fungo *C. kikuchii*

Para obtenção da suspensão de micélios a ser utilizada como elicitor biótico, o fungo *C. kikuchii* foi repicado em placas de Petri contendo 20 mL do meio ágar-tomate (200 mL de polpa de tomate puro, 3 g de cloreto de cálcio, 5 g de dextrose, 20 g de ágar-ágar, água q.s.p. 1000

mL). A suspensão foi preparada de acordo com Xue, Upchurch e Kwanyuen (2006), com as seguintes modificações: as hifas retiradas da placa (2g) foram maceradas com água destilada estéril em almofariz e pistilo, em seguida, transferidas para um borrifador estéril contendo ao final 100 ml de suspensão micelial.

#### **6.8. Inoculação com a suspensão de micélios de *C. kikuchii* e coleta das folhas**

A inoculação das folhas de soja com a suspensão micelial de *C. kikuchii* se deu da seguinte maneira: assim que as plantas atingiram os estádios de desenvolvimento esperados (V<sub>2</sub> e R<sub>5</sub>), o primeiro trifólio de cada planta foi borrifado três vezes em ambas as faces (adaxial e abaxial). O grupo controle foi borrifado apenas com água destilada estéril.

As folhas tratadas e aquelas correspondentes à resposta sistêmica (segundo trifólio) foram excisadas das plantas jovens e adultas nos tempos de 0, 2, 6, 12, 24, 48 h após a inoculação (HAI) e 10 e 15 dias após inoculação (DAI). Imediatamente após a coleta, as folhas foram submersas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer para análises posteriores.

#### **6.9. Detecção de proteínas envolvidas na defesa vegetal**

##### **6.9.1. Detecção de superóxido dismutase (SOD)**

Para determinar a atividade da SOD (VAN ROSSUM; ALBERDA; VAN DER PLAS, 1997) nas folhas coletadas, placas de micropoços, para ensaios de ELISA, foram utilizadas. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente ( $23 \pm 3$  °C) e, em cada poço, 10 µL de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 7,8, 20 µL de EDTA 1 mM, 10 µL de Triton X-100 0,25% (v/v), 20 µL de L-Metionina 130 mM, 100 µL da amostra, 20 µL de nitro azul de tetrazólio 750 µM e 20 µL de riboflavina 10 mM foram adicionados. Após a adição do último reagente, as placas foram cobertas com papel alumínio para, posteriormente, realizar-se a leitura de absorbância a 630 nm, após 5 min de repouso. Em seguida, as microplacas foram postas em uma câmara com luz fluorescente de 32 W sendo feitas leituras a 630 nm, a intervalos de 1 min, até completar o tempo de 5 min de reação. Uma unidade de atividade SOD (1 UA) foi definida como a quantidade de amostra necessária para inibir 50% da fotoredução NBT. A atividade enzimática foi expressa em unidades de atividade por grama de massa fresca de folhas.

### **6.9.2. Detecção de catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi medida segundo Havir e Mchale (1987). Inicialmente, em todos de ensaio, 600 µL de tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,0, foram colocados para incubar a 30 °C por 10 min. Em seguida, 300 µL da amostra e, imediatamente, 100 µL de peróxido de hidrogênio 112,5 mM foram adicionados. As leituras foram feitas em intervalos de 10 s, durante 60 s, após o início da reação. A atividade catalásica foi estimada utilizando-se o coeficiente de absorvitividade molar de  $36 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expressa em mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido/grama de massa fresca de folhas por minuto. O ensaio foi realizado em triplicata.

### **6.9.3. Detecção de peroxidase ascorbato dependente (APX)**

A atividade de APX foi determinada, em triplicata, usando a metodologia descrita por Koshiba (1993). Em tubos de ensaio, 800 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5 mM de ácido L-ascórbico foram adicionados e, em seguida, 100 µl da amostra. A mistura reacional foi incubada a 30 °C, por 10 min, seguido da adição de 100 µl de peróxido de hidrogênio 2 mM. Imediatamente após a incubação, as leituras de absorbâncias, a 290 nm, foram realizadas a intervalos de 30 s durante 180 s. A atividade de APX foi expressa em µmol de ascorbato oxidado/grama de massa fresca de folhas por minuto.

### **6.9.4. Detecção de peroxidase guaiacol dependente (POX)**

A atividade peroxidásica foi determinada com base na metodologia descrita por Urbanek, Kuzniak-Gebrowska e Herka (1991). Nos tubos de ensaio, em triplicata, foram adicionados: 600 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2; 500 µl de guaiacol 20 mM e 500 µl de peróxido de hidrogênio 60 mM. Os tubos foram, então, incubados a 30 °C por 10 min. Em seguida, 200 µl da amostra foram adicionados e, imediatamente, foram feitas as leituras de absorbância, a 480nm, em intervalos de 30 s, durante 180 s, após o início da reação. O resultado da atividade peroxidásica foi expresso em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido/grama de massa fresca de folhas por minuto. O peróxido de hidrogênio consumido foi quantificado a partir da formação do tetraguaiacol, detectado a 480 nm.

#### 6.9.5. Detecção de fenilalanina amônia liase (PAL)

Esta atividade foi determinada segundo a metodologia descrita por El-Shora (2002). A velocidade da produção do ácido *trans*-cinâmico foi determinada usando-se fenilalanina como substrato. Primeiramente, uma curva padrão usando concentrações conhecidas de ácido *trans*-cinâmico foi construída. Para isso, em tubos tipo eppendorf, foram adicionados, à temperatura de 30 °C, os seguintes reagentes: 0 a 900 µL de ácido *trans*-cinâmico 1 mM; 0 a 900 µL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,8 (de forma que a adição de ácido *trans*-cinâmico e tampão juntos encerrem 900 µL) e 100 µL de HCl 600 mM. Depois disso, leituras das absorbâncias a 290 nm foram tomadas e, então, calculado o fator de calibração da curva. Para determinação da atividade enzimática, 20 µL de β-mercaptoetanol 50 mM, 100 µL da amostra diluída e 580 µL do tampão descrito acima e 200 µL de solução de L-Fenilalanina 40 mM foram adicionados nesta ordem descrita. Estes tubos foram incubados a 30 °C, por 60 min, e então foram adicionados 100 µL de HCl  $6 \times 10^{-3}$  mM. Os tubos foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 10 min e leituras de absorbância a 290 nm registradas. O resultado do ensaio foi expresso em µmol ácido *trans*-cinâmico gerado/grama de massa fresca de folhas.

#### 6.9.6. Detecção de quitinase (QUI)

A avaliação da atividade quitinásica teve como parâmetro utilizado a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) a partir da ação hidrolítica da enzima (BOLLER, 1992) sobre quitina coloidal. Primeiramente, para obtenção da curva padrão, em tubos tipo eppendorff (tampa rosqueada), foram adicionados, na seguinte ordem: 100 µL de NAG 1 mM; 400 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e 100 µL de tetraborato de potássio 600 mM. Os tubos foram incubados a 100 °C, por 5 min, imediatamente resfriados em banho de gelo e 1000 µL de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) adicionados. Os tubos foram homogeneizados em vortex e incubados a 37 °C, por 20 min. Imediatamente após a incubação, absorbâncias a 585 nm foram lidas, sendo o fator de conversão calculado.

Para avaliação da atividade enzimática de QUI nas folhas de soja, 250 µL da amostra previamente diluída e 250 µL de quitina coloidal (10 mg/mL) foram misturados. Os tubos, tipo eppendorff, foram homogeneizados e incubados a 37 °C por 60 min, sob leve agitação. Em seguida, esta mistura foi incubada a 100 °C por 5 min e, imediatamente, resfriada em banho de gelo. Após centrifugação ( $10.000 \times g$  por 10 min), 300 µL do sobrenadante foram colocados em novos tubos tipo eppendorf (tampa rosqueada) e 10 µL de uma solução da enzima β-

glucuronidase (EC 3.2.1.31) adicionados. Essa solução de glucuronidase, de *Helix pomatia*, foi preparada por diluição (10x) de uma solução estoque, adquirida comercialmente (Sigma Chemical Company). Estes tubos foram incubados a 37 °C por 60 min, sob leve agitação, incubados, novamente, a 100 °C, por 5 min, e resfriados, imediatamente, em banho de gelo. Para determinação da NAG liberada no ensaio, 190 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e 100 µL de tetraborato de potássio 600 mM foram adicionados aos tubos, sendo, depois, incubados a 100 °C e resfriados em banho de gelo, por 5 min, respectivamente. Por fim, 1000 µL de DMAB (0,05 g/mL), preparado em solução de ácido acético glacial contendo 12,5 % (v/v) de ácido clorídrico  $11,5 \times 10^3$  mM foram adicionados nos tubos. Imediatamente após homogeneização e incubação a 37 °C, por 2 min, leituras de absorbância a 585 nm foram feitas para permitir o cálculo do teor de açúcar liberado no ensaio, com base numa curva padrão construída a partir de soluções de glucose, com concentrações variando de 0,1 a 0,5 mM em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 (REISSIG; STROMINGER; LELOIR, 1955). A atividade quitinásica foi expressa em nKat/grama de massa fresca de folhas, 1 ηKat equivale a 1 ηmol de NAG liberado por segundo.

#### **6.9.7. Detecção de proteases**

A atividade proteolítica foi avaliada segundo metodologia descrita por Xavier Filho e colaboradores (1989). Em tubos tipo eppendorf, 200 µL da solução de azocaseína 1% (m/v, dissolvida em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0), 300 µL deste mesmo tampão, 21 µL de DTT 3 mM e 200 µL da amostra teste (1 mg/mL) foram misturados. Para o controle, em vez da amostra teste, 200 µL do tampão mencionado foram adicionados. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a 37 °C, por 1 h, seguida da adição de 300 µL de TCA 20% (v/v), para interromper a reação. Após centrifugação a  $10.000 \times g$ , por 10 min, 400 µL do sobrenadante foram retirados e, a ele, 400 µL de NaOH 2 M adicionados. A variação de 0,01 da absorbância a 420 nm por min foi assumida como sendo 1 unidade de atividade proteolítica (1 UA). A atividade proteolítica foi expressa em unidades de atividade por grama de massa fresca (UA/gMF).

#### **6.9.8. Detecção de inibidores de proteases serínicas**

A determinação da presença de inibidores de proteases serínicas (tripsina) nas folhas da soja foi realizada de acordo com a metodologia empregada por Erlanger, Kolowsky e Cohen (1961). O primeiro passo foi construir uma curva padrão utilizando alíquotas de 10 a 30  $\mu\text{L}$  de tripsina (0,3 mg/mL). Em seguida, o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM, foi adicionado até completar o volume de 800  $\mu\text{L}$ . Os tubos foram incubados a 37 °C, em banho-maria, por 10 min e, posteriormente, 500  $\mu\text{L}$  da solução de BApNA 1,25 mM (substrato) adicionados. Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37 °C, por 15 min e, em seguida, 120  $\mu\text{L}$  de ácido acético 30% (v/v) adicionados para interromper a reação. Após centrifugação a 10.000  $\times g$ , por 10 min, a 25 °C, leituras de absorbância a 410 nm foram feitas e a curva de calibração construída plotando estas leituras contra o tempo (minutos).

No ensaio de determinação da atividade inibitória de tripsina, inicialmente, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da enzima foi incubada a 37 °C por 10 min, com 100  $\mu\text{L}$  da amostra de folhas soja (1 mg/mL) e 690  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM. Em seguida, o ensaio foi conduzido conforme descrito acima. Para a amostra em branco, a mistura reacional continha tanto a tripsina como a amostra a ser testada, mas a reação foi parada antes da adição do substrato. Uma unidade de atividade inibitória de tripsina (UI) foi definida como sendo a diminuição de 0,01 na absorbância (corrigida) do controle positivo (100% atividade da tripsina), por 1 mL de volume da amostra, na ausência do inibidor a 410 nm. A atividade inibitória foi expressa como unidade inibitória em relação à grama de massa fresca de folhas (UI/gMF). O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **6.9.9. Detecção de inibidores de proteases cisteínicas**

Para determinação da atividade inibitória de proteases cisteínicas (papaína) foi utilizada a metodologia descrita por Abe e colaboradores (1992). À 60  $\mu\text{L}$  de uma solução de papaína (1 mg de papaína dissolvida em água grau Milli-Q, diluída 50x em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0) 40  $\mu\text{L}$  da solução ativadora [tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mM e ditioneitol (DTT) 3 mM] e 200  $\mu\text{L}$  da amostra teste (1 mg/mL) foram adicionados em tubos de ensaio mantidos em banho de gelo. Os tubos foram, então, imediatamente incubados em banho-maria a 37 °C, por 10 min. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  do substrato *N*- $\alpha$ -benzoil-D-arginina- $\beta$ -naftilamida (BANA) 1 mM (dissolvido em 1 mL de dimetilsulfóxido e tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0) foram

acrescidos. Após 20 min, a reação foi parada com 500  $\mu$ L de HCl 2% (v/v) diluído em etanol e os tubos mantidos em temperatura ambiente por mais 5 min. Decorrido esse tempo, 500  $\mu$ L do cromógeno *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) 0,06% (m/v), dissolvido em etanol, foram adicionados. Para a amostra em branco, na mistura reacional havia tanto a papaína como a amostra a ser testada, mas a reação foi parada antes da adição do substrato. Uma unidade de atividade inibitória de papaína (UI) foi definida como sendo a diminuição de 0,01 na absorbância (corrigida) do controle positivo (100% atividade da papaína), por 1 mL de volume da amostra, na ausência do inibidor a 540 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **6.9.10. Detecção de $\beta$ -1,3-glucanase**

A atividade  $\beta$ -1,3-glucanásica foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Boller (1992), medida em função da velocidade de degradação da laminarina (substrato) e formação de glucose. Inicialmente, foi preparada uma solução de laminarina (2 mg/mL) em água grau Milli-Q, aquecida a 60 °C, por 10 min e, em seguida, dialisada exaustivamente contra água destilada para remoção de glucose livre. Nesse experimento, três soluções principais foram utilizadas: Solução A (25 g de carbonato de sódio, 25 g de tartarato de sódio e potássio, 20 g de bicarbonato de sódio, 200 g de sulfato de sódio anidro e água grau Milli-Q q.s.p 100 mL); Solução B (15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado e água grau Milli-Q q.s.p 100 mL) e Solução C (25 g de molibdato de amônio dissolvidos em 21 mL de ácido sulfúrico e 450 mL de água grau Milli-Q e 3 g de arseniato de sódio heptahidratado dissolvidos em 25 mL de água grau Milli-Q). Uma alíquota de 100  $\mu$ L da amostra teste (1 mg/mL) foi incubada com 900  $\mu$ L da solução de laminarina a 50 °C, em banho-maria, durante 30 min. Em seguida, 1 mL da Solução D (mistura da solução B com a solução A, na proporção de 1:25 (v/v), preparada no momento do ensaio) e a mistura reacional incubada a 100 °C, em banho-maria, durante 20 min. Após o período de incubação, as amostras foram resfriadas a 25 °C, por 5 min, após o que 1 mL da solução C foi adicionado. Os tubos foram agitados em vortex para remoção dos gases formados durante a reação e deixados em repouso por 5 min. As leituras de absorbância foram realizadas a 520 nm. Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado, uma curva construída a partir de concentrações variadas de glucose (7 a 240  $\mu$ g/mL, preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2), foi utilizada. A atividade  $\beta$ -1,3-glucanásica foi expressa em nanokatal por grama de massa fresca de folhas ( $\eta$ Kat/gMF), onde 1  $\eta$ Kat equivale a 1  $\eta$ mol/mL de glucose liberado por segundo.

### **6.10. Análise estatística**

Uma unidade amostral equivale a três vasos contendo três plantas em cada um ( $n=9$ ), distribuídos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de t de Student e as diferenças significativas das médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



## 7. RESULTADOS

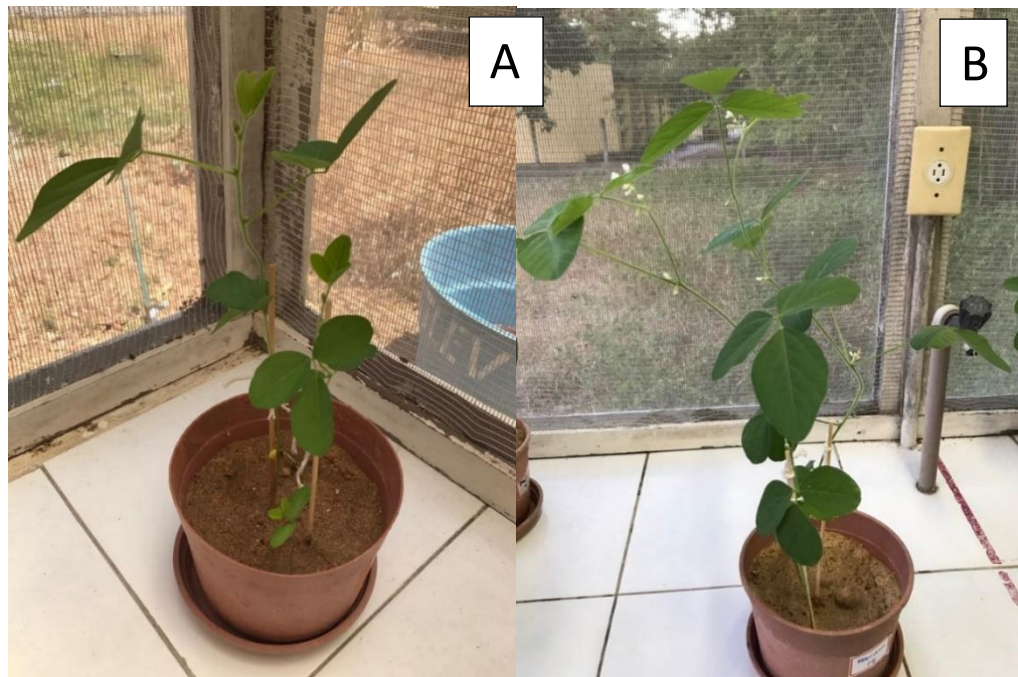
Para melhor compreensão dos dados, os resultados foram divididos em dois tópicos (I e II), abordados no presente trabalho.

### TÓPICO I – TEOR DE PROTEÍNAS E ATIVIDADES ASSOCIADAS ÀS PROTEÍNAS DE DEFESA CONSTITUTIVAS DA SOJA NAS FASES JOVEM E ADULTA DE SEU DESENVOLVIMENTO

#### 7.1 Desenvolvimento e teor de proteína de plantas jovens ( $V_2$ ) e adultas ( $R_5$ )

As plantas jovens ( $V_2$ ) e adultas ( $R_5$ ) de soja apresentaram características morfológicas condizentes com um desenvolvimento normal e saudável. As folhas de soja foram coletadas nos períodos de 21 e 45 dias após o plantio (FIGURA 2).

Figura 2 - Plantas representativas de soja em diferentes estágios de desenvolvimento

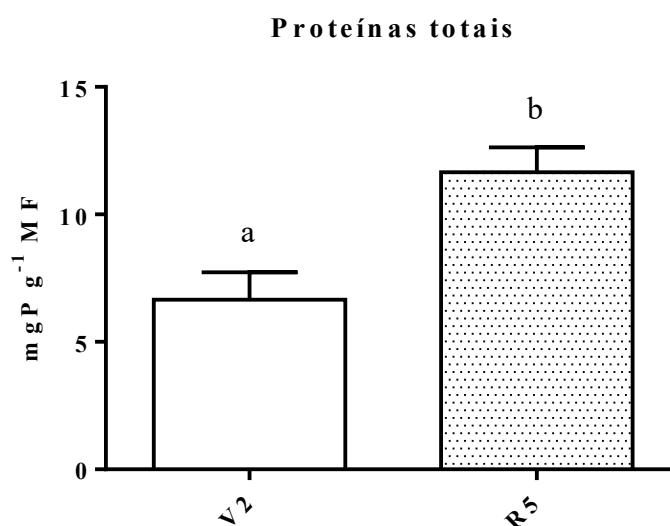


Fonte: própria autora.

(A) planta jovem no estágio  $V_2$ ; (B) planta adulta no estágio  $R_5$ .

Na Figura 3 estão os teores proteicos dos extratos das folhas nos dois estádios de desenvolvimento ( $V_2$  e  $R_5$ ). Os extratos obtidos com folhas jovens e adultas renderam, respectivamente,  $6,65 \pm 1,07$  e  $11,65 \pm 0,98$  mgP/gMF. Na Figura 4 é apresentado o perfil eletroforético do extrato de folhas jovens, onde se vê (raia  $V_2$ ) proteínas de massas moleculares distribuídas acima de 14 kDa e abaixo de 66 kDa, enquanto que aquele do extrato de folhas adultas (raia  $R_5$ ) possui proteínas com massas moleculares distribuídas acima de 20 kDa e abaixo de 90 kDa.

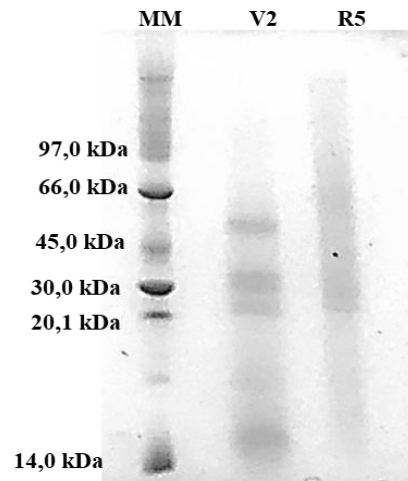
Figura 3 - Teor de proteína dos extratos das folhas de plantas jovens ( $V_2$ ) e adultas ( $R_5$ ) de soja



Fonte: Própria autora.

Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student.

Figura 4 – Perfis de distribuição de proteínas de folhas de plantas jovens e adultas de soja, em relação à massa molecular, após PAGE-SDS (12,5%, m/v)



Fonte: própria autora.

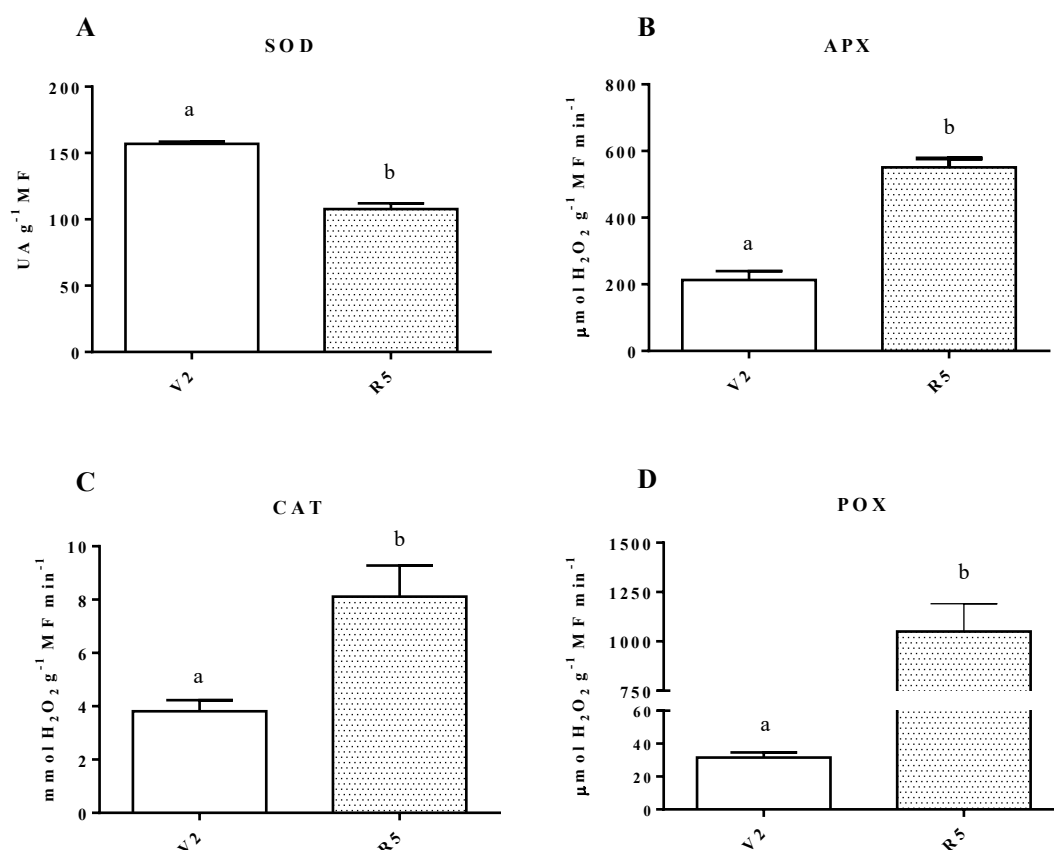
Nas raias estão os marcadores de massa molecular (MM) e os extratos proteicos das folhas de plantas de soja jovens (V2) e adultas (R5). Quantidade de proteína aplicada por raia: 10 µg,

## 7.2. Atividades associadas às proteínas de defesa em folhas de plantas jovens e adultas de soja

### 7.2.1. Atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo

A atividade de SOD (FIGURA 5A) em plantas jovens de soja foi menor 1,4 vezes que em plantas adultas, enquanto que para APX (FIGURA 5B), CAT (FIGURA 5C) e POX (FIGURA 5D) aconteceu o inverso, com valores de atividade 3, 2 e 37 vezes maiores, respectivamente, em plantas adultas quando comparadas com plantas jovens.

Figura 5 - Atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo em folhas de plantas jovens e adultas de soja



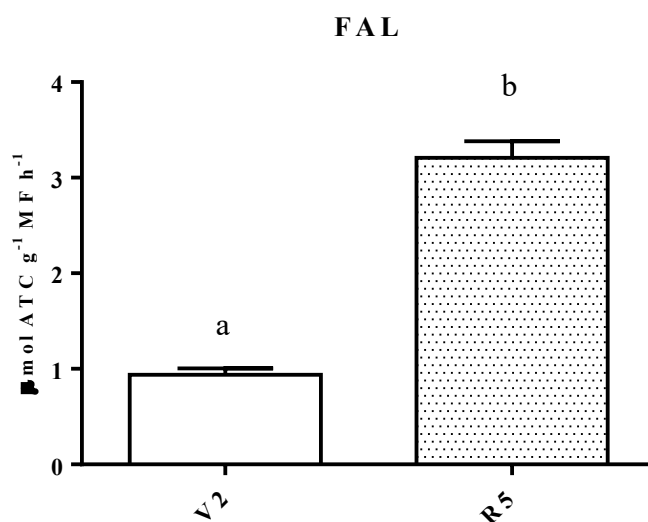
Fonte: Própria autora.

Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student.

### 7.2.2. Atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL)

A atividade da PAL (FIGURA 6) foi cerca de 3,4 vezes maior em folhas adultas, em relação àquela de folhas jovens.

Figura 6 - Atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas de plantas jovens e adultas de soja



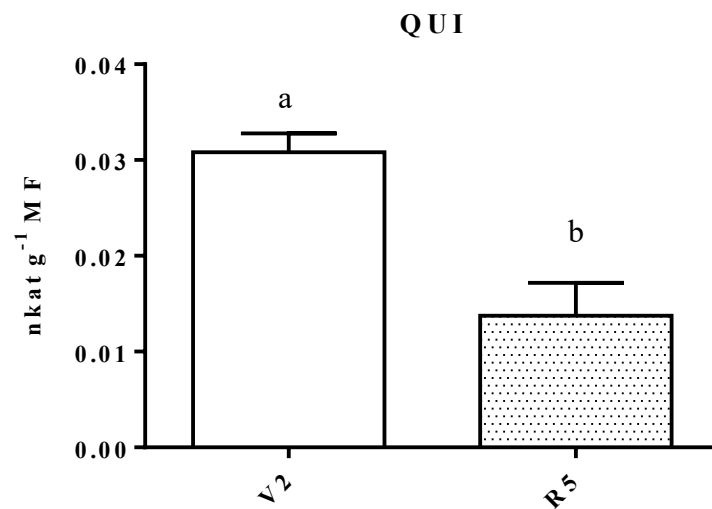
Fonte: Própria autora.

Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student.

### 7.2.3. Atividade quitinásica

A atividade quitinásica (FIGURA 7) em folhas de plantas jovens foi, aproximadamente, 2 vezes superior em relação àquela observada para folhas adultas.

Figura 7 - Atividade quitinásica em folhas de plantas jovens e adulta de soja



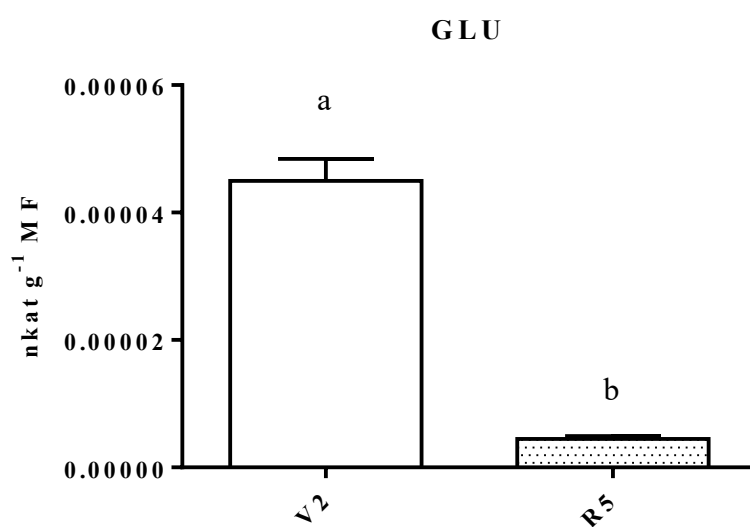
Fonte: Própria autora.

Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student.

#### 7.2.4. Atividade da $\beta$ -1,3-glucanase

Esta atividade (FIGURA 8) foi, aproximadamente, 10 vezes maior em folhas de plantas jovens de soja do que àquela de folhas de plantas adultas.

Figura 8 - Atividade  $\beta$ -1,3-glucanásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja



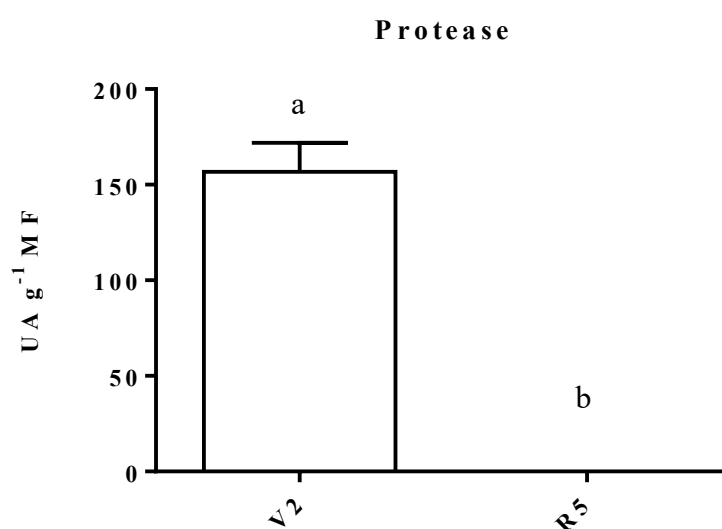
Fonte: Própria autora.

Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student.

### 7.2.5. Atividade proteolítica

Apenas os extratos proteicos de folhas jovens apresentaram atividade proteolítica, enquanto a mesma não foi detectada em plantas de soja adultas (FIGURA 9).

Figura 9 - Atividade proteolítica em folhas de plantas jovens e adultas de soja



Fonte: Própria autora.

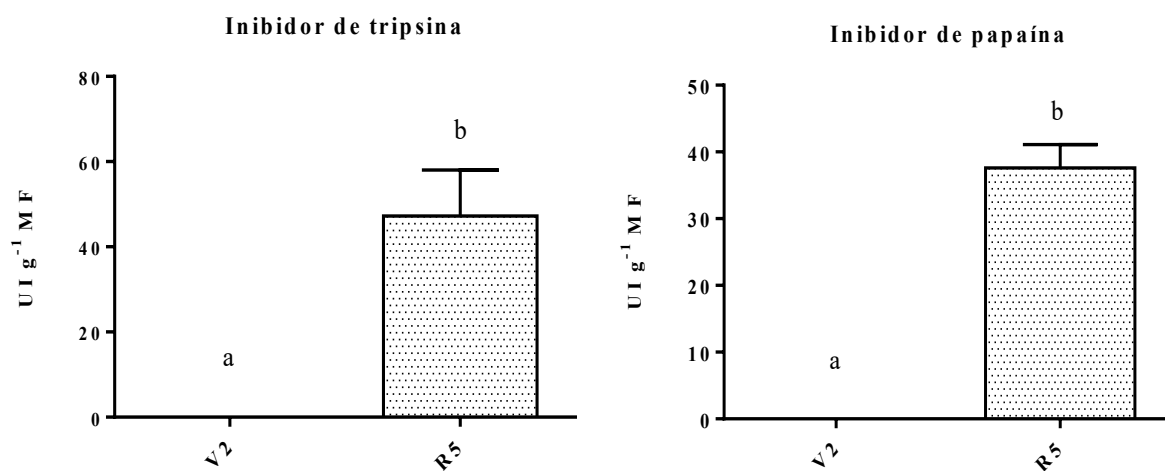
Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student.



### 7.2.6. Atividade de inibidores de proteases

Não foi detectada atividade inibitória de tripsina nem de papaína no extrato proteico de folhas jovens, diferente do que foi observado no extrato de folhas adultas da soja.

Figura 10 - Atividade inibitória de proteases em folhas de plantas jovens e adultas de soja



Fonte: própria autora.

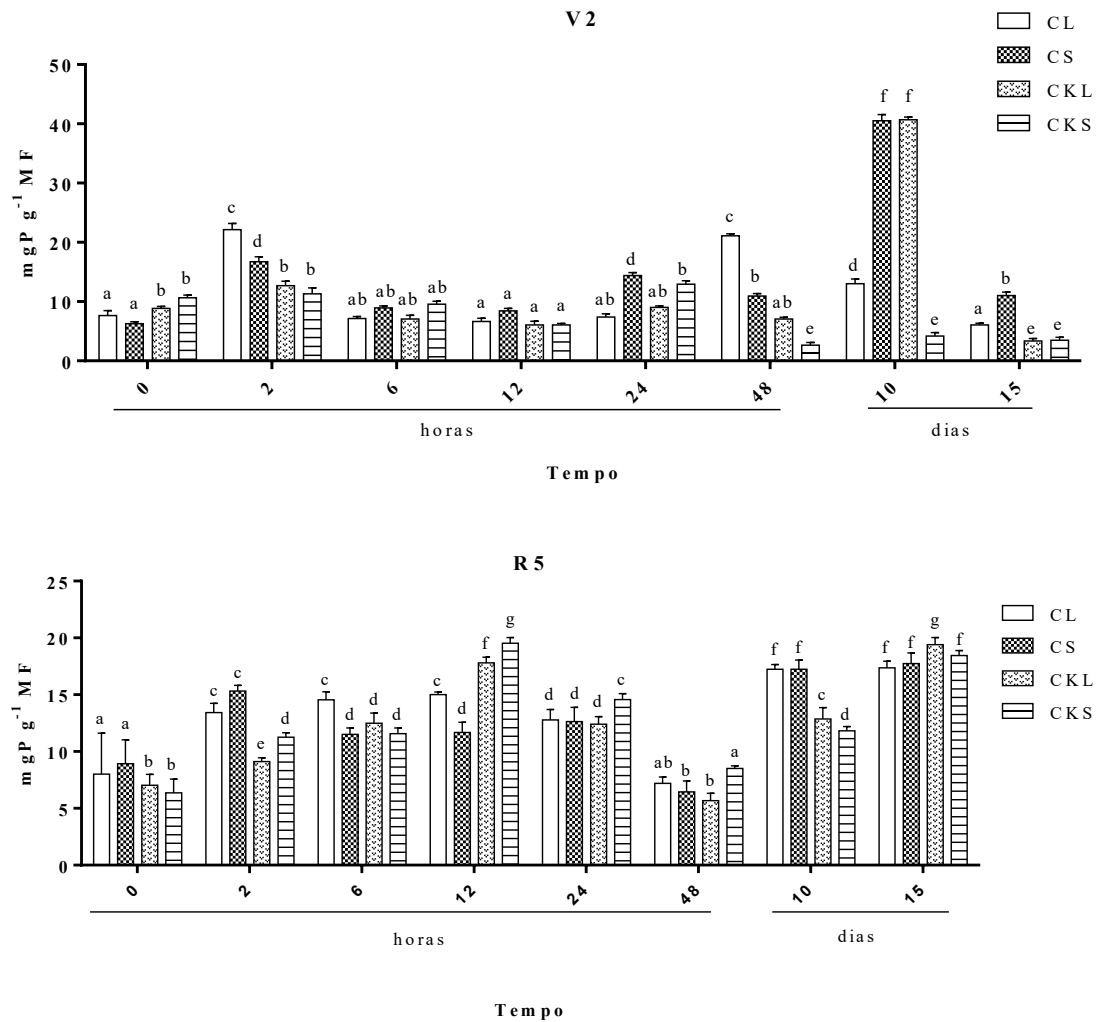
Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student.

## **TÓPICO II–TEOR DE PROTEÍNAS E ATIVIDADES ASSOCIADAS ÀS PROTEÍNAS DE DEFESA EM FOLHAS DE PLANTAS JOVENS E ADULTAS DE SOJA DURANTE SEU DESENVOLVIMENTO INOCULADAS COM *C. kikuchii***

### **7.3 Desenvolvimento e teores de proteínas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii***

Os teores de proteínas dos extratos das folhas infectadas de plantas jovens e adultas de soja estão apresentados na Figura 11. No estágio V<sub>2</sub>, no período de 10 dias após inoculação (DAI), altos teores de proteína (dobro ou acima) nos extratos de folhas inoculadas e nas folhas distantes do local de aplicação dos esporos do fungo (resposta sistêmica), foram encontrados, em comparação aos respectivos controles. Já no estágio R<sub>5</sub>, maiores quantidades de proteína 12 horas após inoculação (HAI), tanto para folhas infectadas com *C. kikuchii* quanto para a resposta sistêmica, quando comparados com os seus respectivos controles, foram evidenciadas. Em relação aos outros tempos, os valores permaneceram abaixo do controle, havendo leve aumento apenas no período de 15 DAI.

Figura 11 - Teores de proteínas dos extratos de folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*

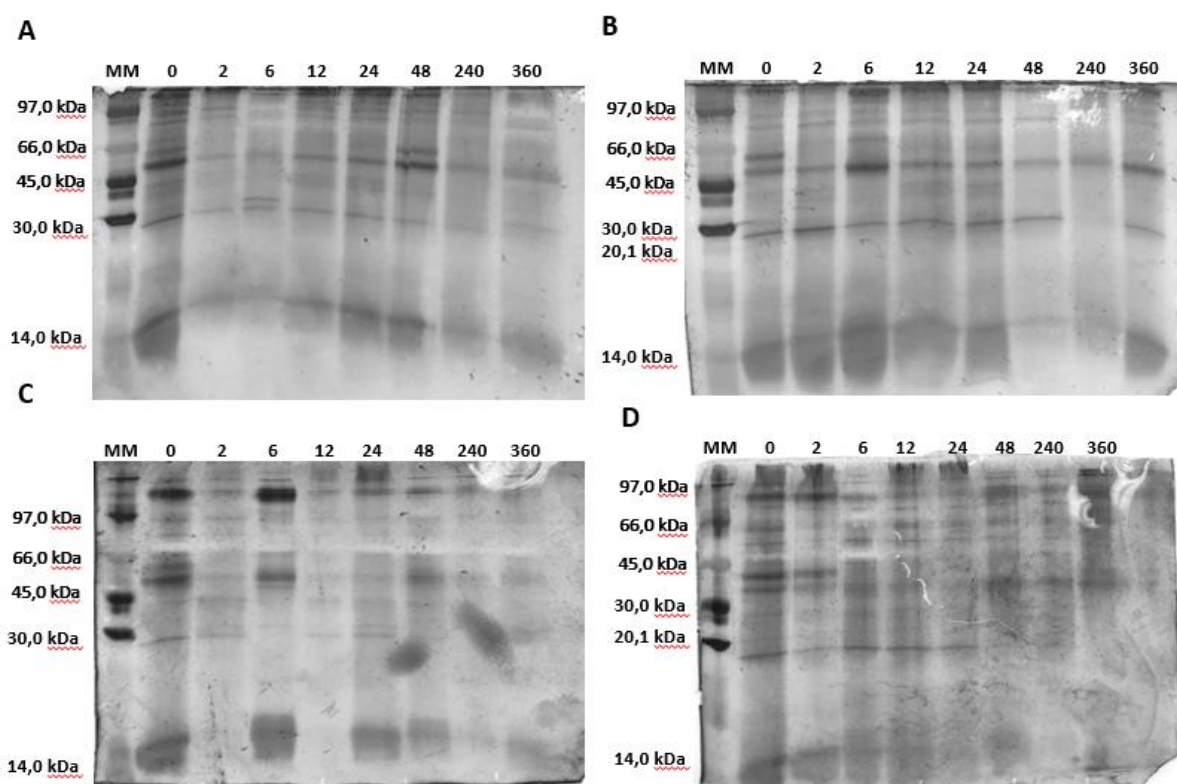


Fonte: Própria autora.

Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com teste t de Student. Controle Local (CL), Controle Sistemico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistemico (CKS).

Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida sob condições redutoras (SDS-PAGE) revelou a presença de várias proteínas com massas moleculares variando entre 97 kDa e 14 kDa (FIGURA 12), além de diferenças em seus perfis, quando comparado com seus respectivos controles, pois há o aparecimento de outras bandas entre 66 e 45 kDa e entre 45 e 30 kDa. Na Figura 13 observa-se proteínas menores com duas bandas proteicas mais evidentes com massas moleculares acima de 45 kDa e próxima de 30 kDa nos controles e massas moleculares próximas de 30 kDa, 45 kDa e 14 kDa nos extratos inoculados. Também, diferenças nas intensidades das bandas quando comparados os perfis dos extratos proteicos oriundos de plantas inoculadas com o fungo com àqueles oriundos de plantas não-inoculadas (controles) foram observadas.

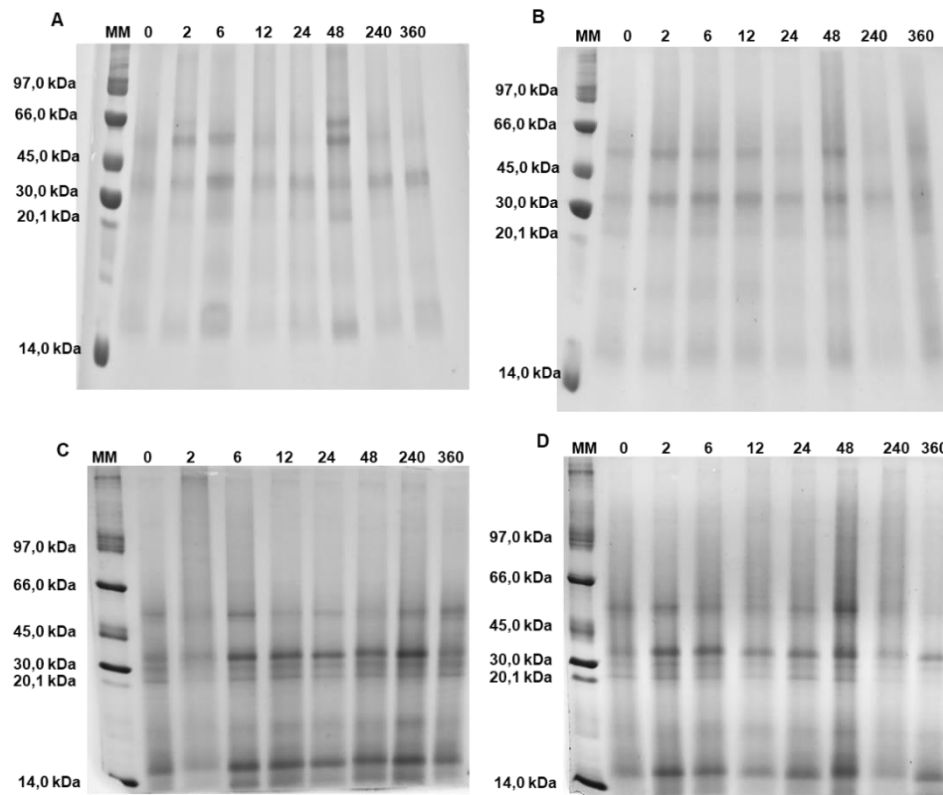
Figura 12 - Perfis de distribuição de proteínas de folhas de plantas jovens de soja, controles e inoculadas com *C. kikuchii*, em relação à massa molecular, após PAGE-SDS (12,5%, m/v)



Fonte: própria autora.

Nas raíais estão os marcadores de massa molecular (MM) e os extratos de folhas jovens em seus respectivos tempos após infecção com *Cercospora kikuchii*: 0, 2, 6, 12, 24, 48 horas e 10 e 15 dias. (A) extratos referentes ao controle local. (B) extratos referentes ao controle sistêmico. (C) extratos referentes à infecção local com *Cercospora kikuchii*. (D) extratos referentes à resposta sistêmica da infecção. Quantidade de proteína aplicada por raia: 10 µg.

Figura 13 - Perfis de distribuição de proteínas de folhas de plantas adulta de soja, controles e inoculadas com *C. kikuchii*, em relação à massa molecular, após PAGE-SDS (12,5%, m/v)



Fonte: própria autora. Nas raia estão os marcadores de massa molecular (MM) e os extratos de folhas adultas em seus respectivos tempos após infecção com *Cercospora kikuchii*: 0, 2, 6, 12, 24, 48 horas e 10 e 15 dias. (A) extratos referentes ao controle. (B) extratos referentes ao controle sistêmico. (C) extratos referentes à infecção com *Cercospora kikuchii*. (D) extratos referentes à resposta sistêmica da infecção. Quantidade de proteína aplicada por raia: 10 µg.

## ***7.4 Atividade de proteínas associadas à defesa***

### ***7.4.1 Atividade de SOD***

A Figura 14 mostra a atividade enzimática da SOD presente nos diferentes extratos de folhas nas duas fases de desenvolvimento da soja. Não houve diferenças significativas entre as atividades detectadas para as respostas local e sistêmica para a fase adulta (V<sub>5</sub>). Já nas plantas jovens infectadas, diminuição imediata de 1,7 e 2,4 vezes para as respostas local e sistêmica (V<sub>2</sub>), respectivamente, foi observada em 2 HAI. Ainda nas plantas jovens, um aumento de 2,3 vezes para a resposta local foi observado para a atividade dismutásica, aos 10 DAI. Quanto à resposta sistêmica, a atividade da SOD foi 2 vezes maior nas plantas inoculadas em relação às plantas controles aos 15 DAI.



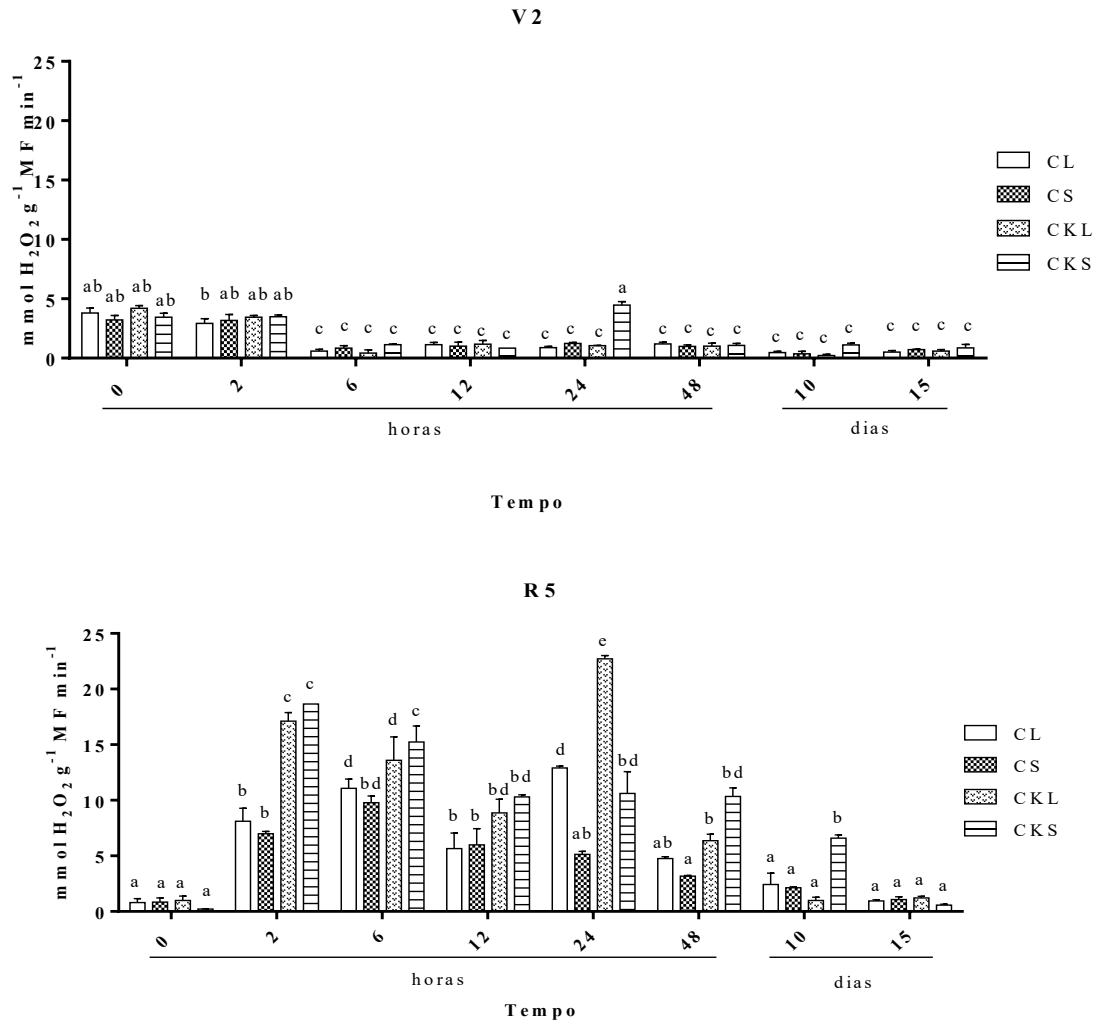
#### 7.4.2 Atividade catalásica

Plantas de soja no estágio V<sub>2</sub>, quando inoculadas com *C. kikuchii*, não apresentou diferenças significativas para a resposta local em relação ao controle em nenhum dos tempos analisados. Contudo, foi detectada resposta sistêmica, na qual a atividade de CAT foi cerca de 3,6 vezes maior do que o seu respectivo controle no período de 24 HAI.

No estágio R<sub>5</sub>, a atividade de CAT foi 2 vezes maior em 2 HAI e de 1,7 em 24 HAI para resposta local em relação ao controle. Já para a resposta sistêmica, a atividade de CAT teve um pico máximo (2,6 vezes) em 2 HAI, e manteve valores acima dos respectivos controles até 10 DAI (FIGURA 15).



Figura 15 - Atividade catalásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*



Fonte: Própria autora.

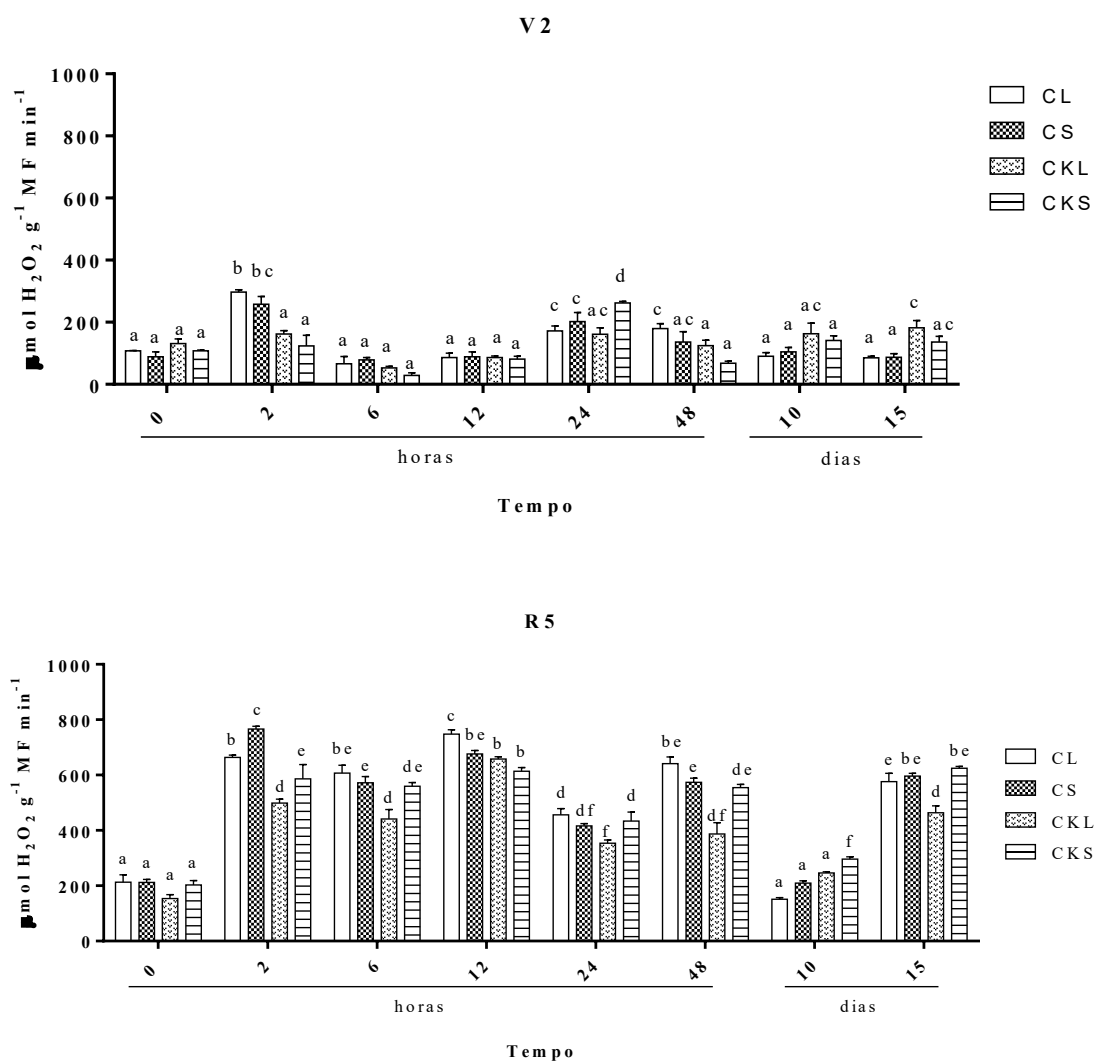
Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistemico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistemico (CKS).

#### **7.4.3 Atividade da APX**

Os dados experimentais obtidos (FIGURA 16) mostraram que em plantas jovens a resposta local se caracterizou pela redução da atividade da APX em 1,8 e 1,3 vezes em 2 e 48 HAI, respectivamente, em relação aos respectivos controles. Porém, a APX aumentou 2 vezes em relação ao seu controle, aos 15 DAI. Em relação à resposta sistêmica, a atividade de APX diminuiu 2 vezes em 2 HAI, mas aumentou 1,3 vezes em 24 HAI, em comparação aos controles correspondentes.

Nas plantas adultas, houve diminuição da atividade de APX nos tempos de 2, 6, 12, e 24 HAI, bem como 15 DAI. Porém, a maior taxa de redução (1,4 vezes menor) ocorreu 6 HAI. Na resposta sistêmica, houve redução de 2,1 vezes na atividade de APX 2 HAI, mas houve aumento de 1,4 vezes em 10 DAI, quando comparado com os respectivos controles.

Figura 16 - Atividade da APX em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*



Fonte: Própria autora.

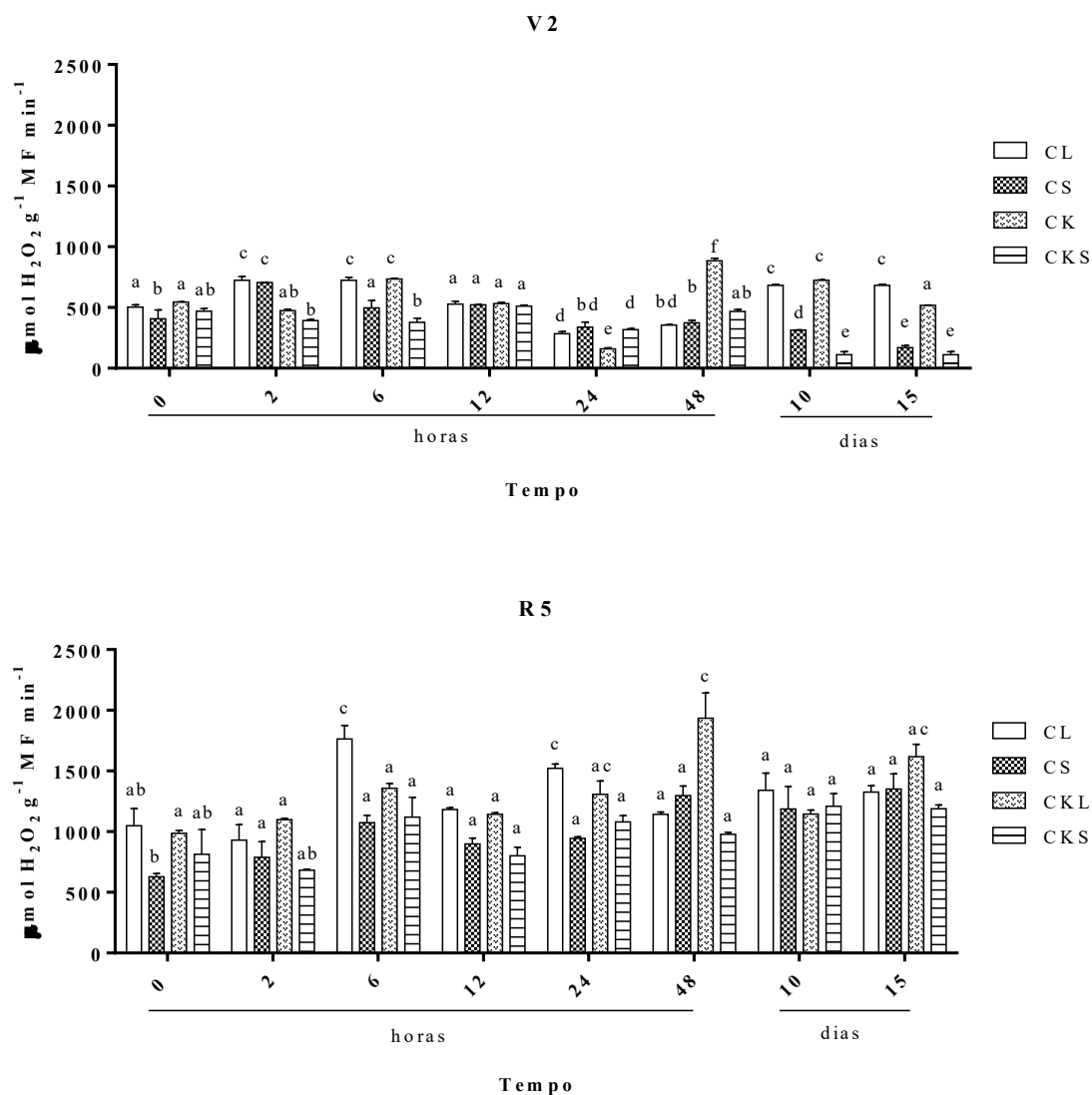
Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistêmico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistêmico (CKS).

#### **7.4.4 Atividade da POX**

Em relação à atividade da POX (FIGURA 17), nas plantas jovens houve aumento de 2,5 para resposta local 48 HAI. Ainda para a resposta local foram verificados decréscimos na atividade peroxidásica nos tempos 2, 24 HAI e 15 DAI, sendo a maior taxa de redução (1,5 vezes) detectada em 2 HAI. Já na resposta sistêmica houve reduções na atividade nos tempos de 2, 6 HAI e 10 DAI.

Em plantas adultas, de forma similar ao encontrado em plantas jovens, detectou-se aumento na atividade 48 HAI, porém com uma taxa de aumento de 1,7 vezes. Também, resposta local com decréscimo de 1,3 vezes na atividade de POX foi observada 6 HAI. Não houve diferenças significativas na resposta sistêmica em relação ao seu controle.

Figura 17 – Atividade da POX em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*



Fonte: Própria autora.

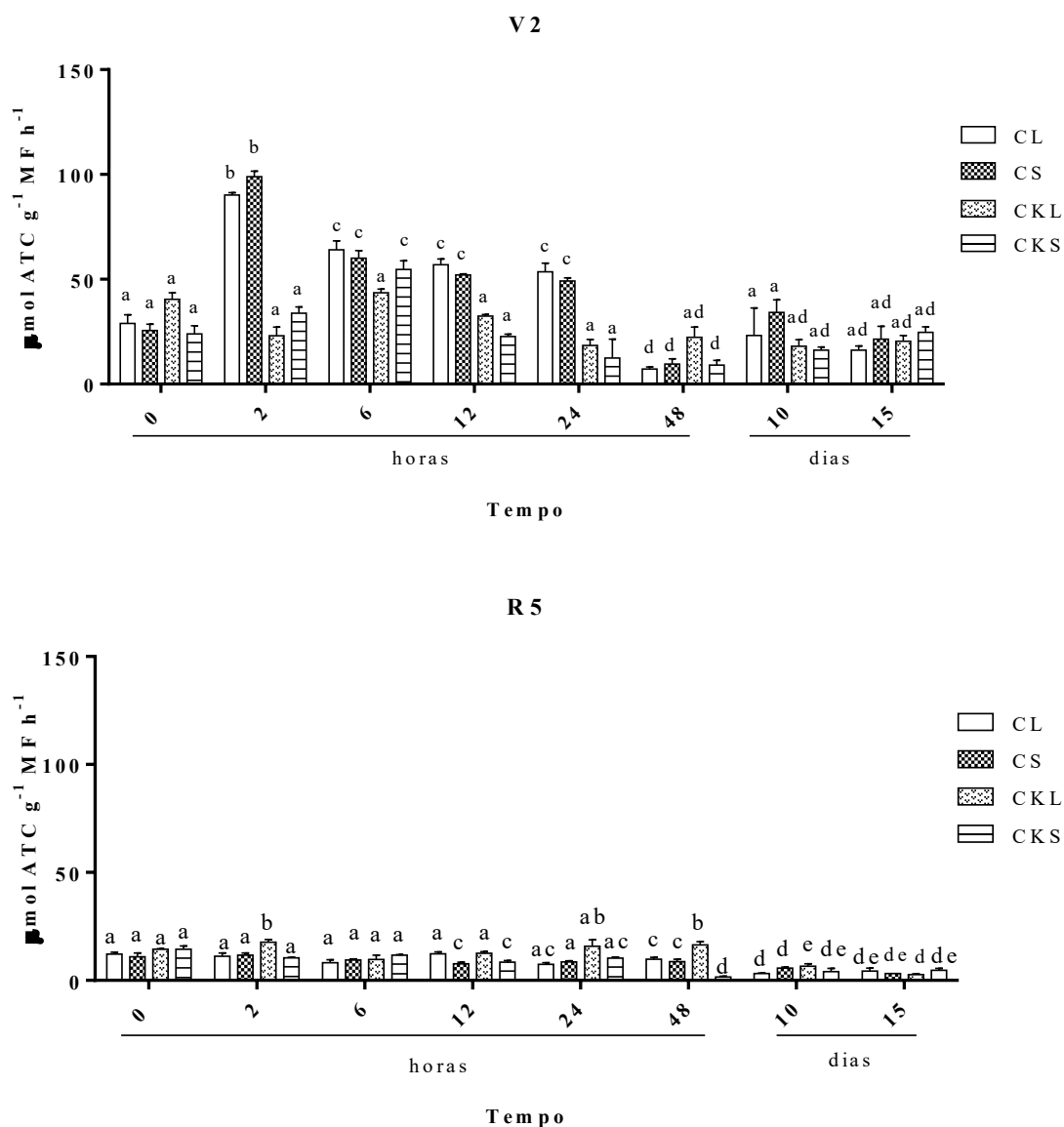
Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistemico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistemico (CKS).

#### **7.4.5 Atividade da PAL**

Para a resposta local, houve redução na atividade da PAL 2, 6, 12 e 24 HAI, com redução mais intensa (4 vezes) logo após à inoculação com o fungo (2 HAI) em comparação aos respectivos controles. Quanto à resposta sistêmica reduções nos tempos iniciais da infecção, nos períodos de 2, 12 e 24 HAI, também foram observadas, havendo decréscimo mais acentuado (3,3 vezes) 2 HAI, quando comparado ao controle.

Já para as plantas adultas, aumentos significativos da atividade da PAL, em relação aos respectivos controles, foram detectados 2, 48 HAI, bem como 10 DAI, para a resposta local. Para a resposta sistêmica, a atividade da PAL reduziu (de cerca de 4 vezes) apenas 48 HAI, quando comparado com seu respectivo controle.

Figura 18 - Atividade da PAL em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*



Fonte: Própria autora.

Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistemico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistemico (CKS).

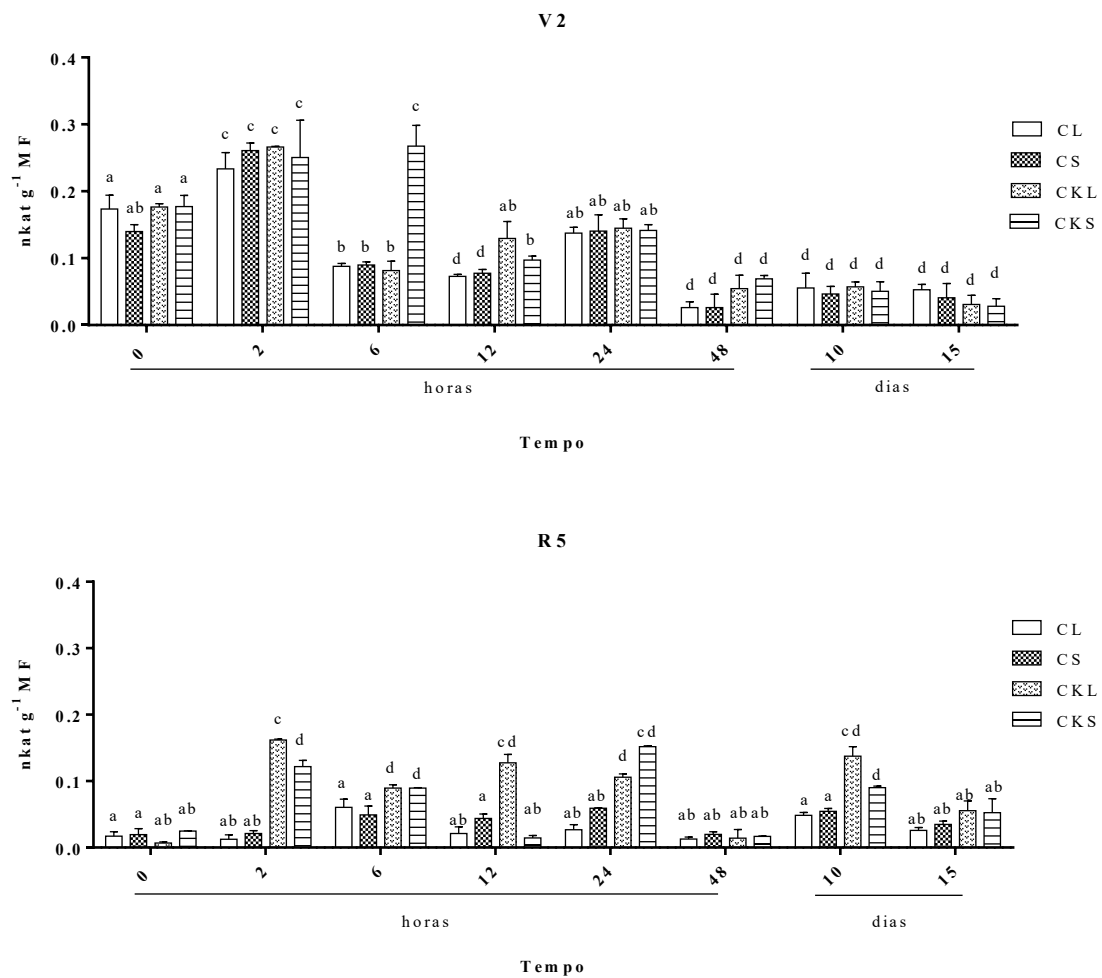
#### **7.4.6 Atividade quitinásica**

A atividade quitinásica apresentou valores que não diferiram significativamente comparados com aqueles dos respectivos controles em plantas jovens (FIGURA 19), com exceção, apenas, nos tempos de 12 HAI, quando foi observado aumento de 1,4 vezes em relação à resposta local e 6 HAI, quando houve aumento de 3,1 vezes para a resposta sistêmica.

Em plantas adultas, altos valores da atividade quitinásica foram observados na resposta local nos tempos de 2, 6, 12, 24 HAI e 10 DAI, com aumento destacado de atividade (12,8 vezes maior) em relação ao seu respectivo controle, no tempo de 2 HAI. Para a resposta sistêmica, houve aumento da atividade nos tempos de 2, 6, 24 HAI e 10 DAI, sendo o maior aumento observado no tempo de 2 HAI, ou seja, 5,8 vezes maior que o seu controle.



Figura 19 - Atividade quitinásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*



Fonte: Própria autora.

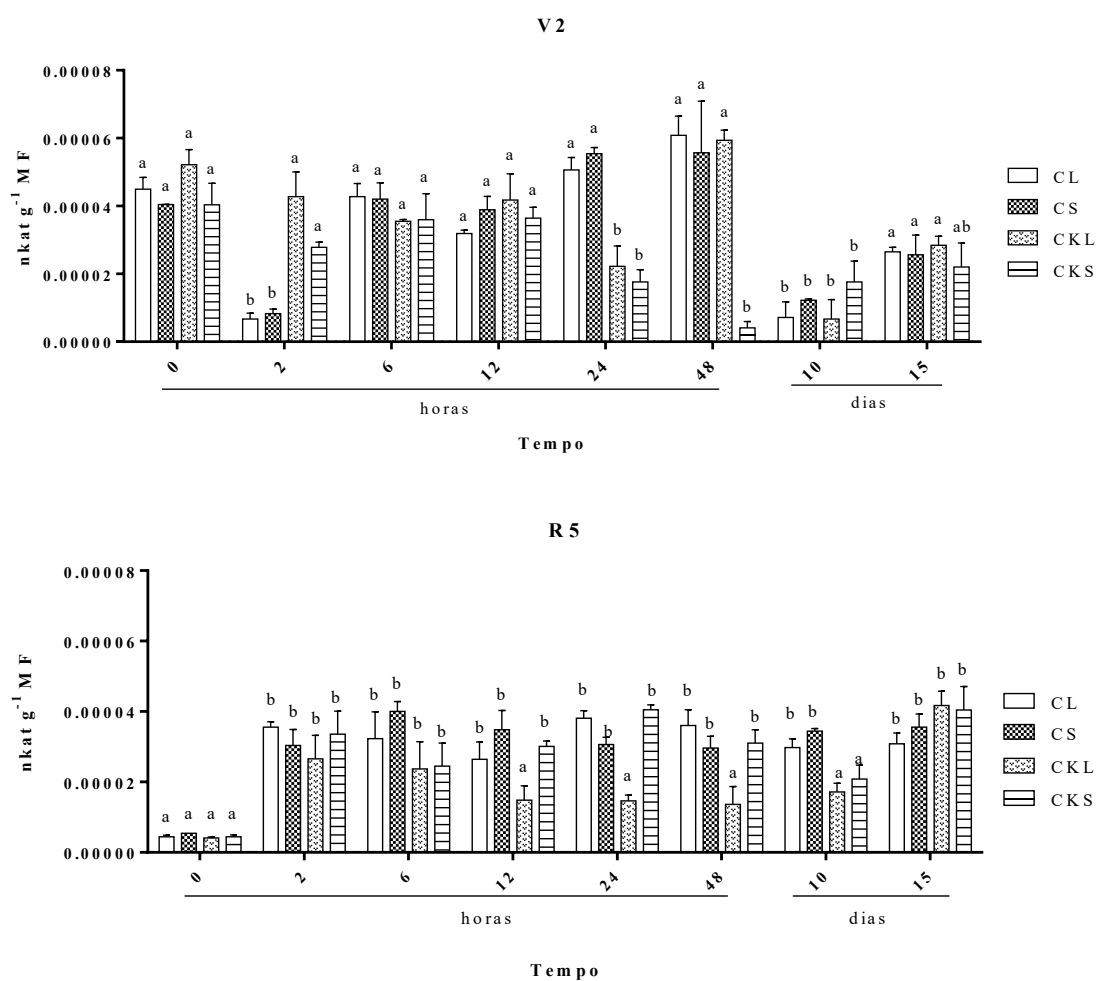
Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistemico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistemico (CKS).

#### ***7.4.7 Atividade glucanásica***

Em plantas jovens, em sua resposta local, houve aumento de 7,8 vezes na atividade glucanásica no tempo de 2 HAI e um declínio de 2,2 vezes em 24 HAI (FIGURA 20). Para a resposta sistêmica, houve aumento de 3,5 vezes 2 HAI e reduções em 24 e 48 HAI, de 3,1 e 14 vezes, respectivamente.

Em plantas adultas, para a resposta local, os valores de atividade permanecem abaixo dos respectivos controles a partir de 12 HAI até 10 DAI, com maior taxa de redução, de 2,6 vezes, 2 HAI. Já na resposta sistêmica, a atividade foi reduzida em 1,7, aos 10 DAI.

Figura 20 - Atividade glucanásica em folhas de plantas jovens e adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*



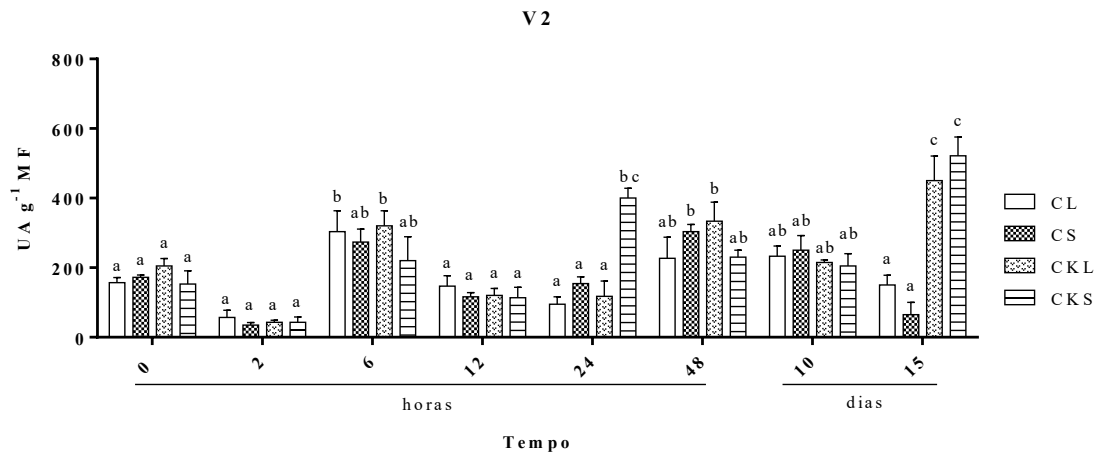
Fonte: Própria autora.

Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistêmico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistêmico (CKS).

#### ***7.4.8 Atividade proteásica***

A Figura 21 destaca os valores referentes à atividade proteásica apenas nas plantas jovens, visto que não foi detectada atividade nas plantas adultas. Durante os tempos de inoculação, a atividade proteolítica para a resposta local manteve-se similar aos seus respectivos controles, com exceção de um aumento de 2,7 vezes na atividade proteolítica aos 15 DAI. Para a resposta sistêmica, houve aumento da atividade nos tempos de 24 HAI e 15 DAI, quando ocorreu o maior aumento (cerca de 7,5 vezes) em relação ao controle.

Figura 21 – Atividade proteásica em folhas de plantas jovens de soja inoculadas com *C. kikuchii*



Fonte: própria autora.

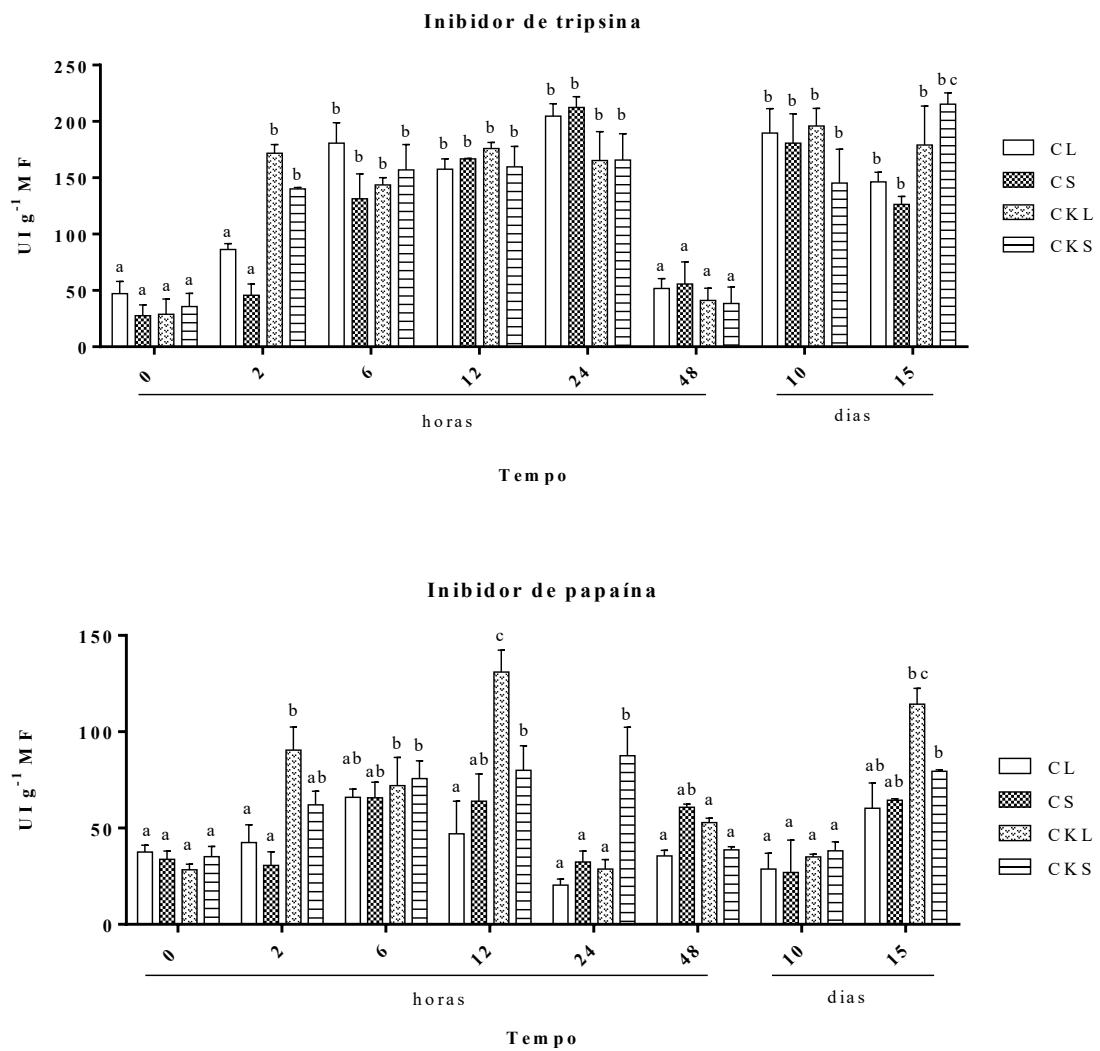
Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistemico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistemico (CKS).

#### ***7.4.8 Atividade de inibidores de proteases***

As atividades inibitórias de tripsina e papaína só foram detectadas em plantas adultas. Para inibição de tripsina, aumentos foram detectados somente com 2 HAI, tanto para resposta local quanto para a resposta sistêmica, sendo 2 e 4,3 vezes maior que os respectivos controles.

Para inibição de papaína na folha local da inoculação do fungo, a atividade inibitória aumentou nos tempos de 2 HAI (2,2 vezes) e 12 HAI (2,7 vezes) e, também, aos 15 DAI (1,9 vezes em relação aos respectivos controles. Para as respostas sistêmicas, houve aumento da atividade de 2,7 vezes 24 HAI (FIGURA 22).

Figura 22 - Atividade de inibidores de proteases em folhas de plantas adultas de soja inoculadas com *C. kikuchii*



Fonte: Própria autora.

Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias em diferentes fases de desenvolvimento da soja, de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey. Controle Local (CL), Controle Sistêmico (CS), *Cercospora kikuchii* Local (CKL), *Cercospora kikuchii* Sistêmico (CKS).

## 8. DISCUSSÃO

A literatura pertinente relata que o fungo *C. kikuchii* se desenvolve apenas em folhas no estágio reprodutivo da soja (CHANDA *et al.*, 2014). Porém, não existem dados acerca das proteínas envolvidas no mecanismo de defesa da soja em diferentes fases de seu desenvolvimento contra o fungo *C. kikuchii*. Com o objetivo de gerar dados acerca de quais proteínas estariam envolvidas na resistência da planta jovem contra este fungo, fez-se, inicialmente, detecções das principais proteínas de defesa constitutivas na soja nos estádios V<sub>2</sub> (jovem) e R<sub>5</sub> (adulta).

Em relação às proteínas relacionadas ao estresse oxidativo foi observado que a SOD apresentou maior atividade nas plantas jovens (FIGURA 5A). Esta enzima catalisa a dismutação de moléculas de superóxido em moléculas de oxigênio (O<sub>2</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os íons superóxidos são gerados como resultado de reações fisiológicas das plantas e estresses abióticos ou bióticos (LESHEM, 1988; GAO *et al.*, 2010). Já em plantas adultas foram detectadas maiores atividades de enzimas peroxidases sugerindo maior necessidade de redução de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessa fase de desenvolvimento da planta.

As enzimas PAL e POX catalisam a conversão de moléculas vegetais em precursores da lignina. A PAL catalisa a desaminação da fenilalanina transformando em ácido transcinâmico, enquanto a POX catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxycinâmico, em presença de peróxido de hidrogênio, originando a lignina (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001; VAN LOON; STRIEN, 1999). Maiores atividades dessas enzimas foram observadas para as plantas na fase adulta, inferindo-se que nessa fase hajam maiores concentrações de lignina (FIGURAS 5 e 6). Esses dados vão de acordo com o estudo realizado para avaliação quantitativa de lignina em diferentes espécies vegetais como aveia (*Avena sativa*), capim-marandu (*Brachiaria brizantha*), capim setária (*Setaria anceps*), siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e soja perene (*Neonotonia wightii*), as quais obtiveram maiores concentrações de lignina em paredes celulares na fase adulta quando comparada com a fase jovem (FUKUSHIMA; SAVIOLI, 2001).

Na defesa vegetal as enzimas quitinase e  $\beta$ -1-3-glucanase possuem função de degradar a parede celular de fungos fitopatogênicos. Em estudos realizados com linhagens de cevada, uva e batata foram observadas maiores quantidades de quitinases e  $\beta$ -1-3-glucanases para os cultivares resistentes ao ataque de fungos quando comparados aos seus cultivares susceptíveis (IGNATIUS; CHOPRA; MUTHUKRISHNAN, 1994; BUSAM, KASSEMAYER, MATERN, 1997; WEGENER *et al.*, 1996). Esses dados sugerem que um dos motivos que tornariam as



plantas adultas de soja menos tolerantes ao ataque de *Cercospora kikuchii* seriam as baixas atividades detectadas para estas enzimas constitutivamente.

A atividade proteolítica não foi detectada em plantas adultas, sendo observada apenas em plantas jovens. Diante disso, esse resultado pode estar associado às suas diversas funções nas fases iniciais de desenvolvimento da planta. Van der Hoorn (2008) citou algumas proteases que estão envolvidas no desenvolvimento de estruturas vegetais e também no crescimento da planta.

Inibidores de proteases vegetais possuem diversas funções no metabolismo vegetal, dentre elas o papel de regular proteases endógenas (RICHARDSON, 1977). Não foi detectado a presença de inibidores de proteases na fase jovem da soja, estando, provavelmente, relacionado de forma inversa com a grande quantidade de proteases detectadas nessa mesma fase de desenvolvimento.

Já é relatado na literatura a diferença de graus de susceptibilidade da soja contra *Colletotrichum truncatum* em diferentes fases de seu desenvolvimento (COSTA *et al.*, 2006). Logo, esse trabalho buscou também avaliar as principais diferenças encontradas em proteínas de defesa induzidas em resposta ao ataque de *C. kikuchii* em plantas de soja jovens e adultas.

No que se refere a SOD, foram observados aumentos na atividade dismutásica em relação ao controle apenas na fase jovem nas respostas local e sistêmica. Em um estudo realizado com folhas de *Vigna unguiculata* infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*, atividade de SOD foi maior para o genótipo resistente quando comparado ao susceptível após inoculação de ambos com o patógeno (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

As enzimas CAT e APX possuem função de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Nas respostas locais aumentos da atividade catalásica foram observados apenas em plantas adultas (FIGURA 15). Quanto à atividade da APX, em plantas jovens maior taxa de redução da resposta local em relação ao controle foi observada quando comparado com as plantas adultas (FIGURA 16). A redução da atividade de SOD e os aumentos das atividades de APX e CAT sugerem o aumento de  $H_2O_2$  quando a planta está na fase adulta, tais dados obtidos estão de acordo com Varela e colaboradores (2017) que relataram a importância do acúmulo de  $H_2O_2$  na defesa de *Vigna unguiculata* contra o Vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV), porque esta molécula seria tóxica para patógenos, por atacar componentes celulares por meio de radicais livres, e poderia, também, ocasionar morte celular programada em células da planta, evitando, assim, a propagação do vírus. Porém, como se trata de um fungo necrotrófico a morte celular programada pode ser prejudicial a planta por desencadear o desenvolvimento do fungo.

A defesa das plantas pode se dar pelo fortalecimento de suas barreiras físicas através da produção de compostos fenólicos que, posteriormente, são convertidos à lignina. Dentre as enzimas responsáveis pela produção de precursores da lignina encontram-se a PAL e POX, que foram encontradas em maiores quantidades em plantas de soja adultas inoculadas. Esses resultados apontam que nessa fase, ocorrem reações de lignificação da parede celular, processo que além de impedir a invasão de patógenos, também reduz o transporte de nutrientes da planta para o fungo e diminui a difusão de toxinas do fungo para as células da planta, que é extremamente importante em fungos que possuem fatores de virulência, como é o caso do *C. kikuchii* que produz a cercosporina (NILCHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

A redução da atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase observada em plantas adultas pode estar associada a um possível acúmulo de calose no espaço entre a membrana plasmática e a parede celular vegetal. A calose trata-se de uma estrutura física formada por  $\beta$ -1,3-glucanos que tem função de dificultar e/ou impedir a penetração dos patógenos nas plantas (CHEN; KIM, 2009; CLETUS *et al.*, 2013). Essa relação entre a redução da atividade glucanásica com a deposição de calose na célula vegetal também foi relatada por Varela e colaboradores (2017).

A alta atividade quitinásica em folhas já é descrito na literatura em respostas de defesa contra fungos do gênero *Cercospora*. Nascimento e colaboradores (2014) afirmaram que quitinase seria mais importante em plantas de soja do que a  $\beta$ -1,3-glucanase no combate as manchas foliares causadas por *Cercospora sojina*. Roulin e Buchala (1995) reportaram que somente a quitinase seria essencial na resistência de *Arachis hypogaea* contra infecções de *Cercospora arachidicola*. No presente trabalho, visto que em folhas adultas menores teores de quitinase constitutiva foram encontrados, tornou necessário sua síntese ao longo da resposta de defesa, o que explica o aumento da atividade. Já em plantas jovens, a resposta constitutiva dessa enzima já era alta e manteve-se alta em sua resposta induzida nos períodos iniciais da infecção.

Alguns trabalhos relacionam a atividade das proteases vegetais em processos de inibição de germinação de esporos e de tubos germinativos, além da sua atuação no reconhecimento de fitopatógenos pela planta no intuito de controlar e eliminar ataques de patógenos (ROJO *et al.*, 2004; BANANI *et al.*, 2014; MISAS-VILLAMIL; VAN DER HOORN; DOEHLEMAN, 2016). No presente trabalho, foi verificada atividade proteásica durante o processo de infecção da soja com o *C. kikuchii*.

Os inibidores de proteases possuem função de bloquear a catálise de proteases específicas impedindo de realizar suas funções. Em alguns casos, os inibidores podem causar desajustes no metabolismo impedindo que proteases realizem suas funções benéficas para as plantas. Krüger e colaboradores (2002) relataram em tomate a ação de inibidores de proteases

cisteínicas que causariam bloqueio do reconhecimento do fungo pela planta. Assim, a indução de inibidores de proteases na fase adulta da soja ao longo do desenvolvimento da doença pode ter impedindo a atuação dessas proteases.

Sabendo-se que uma infecção local pode desencadear a produção de moléculas sinalizadoras para outras partes da planta, também foi avaliada uma possível resposta sistêmica em plantas de soja inoculadas com o *C. kikuchii*. Tanto em plantas jovens quanto em plantas adultas respostas sistêmicas com diferenças em relação ao controle para todas as proteínas de defesa detectadas foram constatadas, com exceção das enzimas SOD e POX em plantas adultas.

A resposta sistêmica está relacionada com as respostas de defesa da planta em áreas próximas de onde está havendo o contato com o patógeno. O desencadeamento da resposta sistêmica é sinalizado pelo ácido salicílico entre outras moléculas. Um estudo recente mostrou a relação de moléculas de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio no desencadeamento da resistência sistêmica (WENDEHENNE *et al.*, 2014). Diante disso, as enzimas antioxidantes, como CAT e APX, teriam participação na regulação de concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também estariam envolvidas na expressão de respostas sistêmicas (ROMERO-PUERTAS; SANDALIO, 2016). Quando em contato com o local de infecção, a molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> funciona como um sinalizador local para os eventos de morte celular programada, além de estimular respostas de genes de defesa em locais adjacentes, a resposta sistêmica adquirida. (OROZCO-CÁRDENAS; NARVÁEZ-VÁSQUEZ; RYAN, 2001).

Sendo assim, estudos posteriores para averiguação de teores endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas de soja inoculadas com *C. kikuchii* se fazem necessários a fim de se avaliar o seu papel ao longo da defesa da planta na fases jovem e adulta. Além de estudos para quantificação da toxina cercosporina, a fim de avaliar sua importância no processo de infecção pelo fungo e relacionar com as atividades enzimáticas em questão. Estudos para detecção de calose e quantificação de lignina também se fazem necessários.

## 9. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram a regulação dos teores de proteínas de defesa em plantas de soja quando inoculadas com *C.kikuchii* e a potencial estratégia de defesa utilizada pelas plantas jovens que as tornam resistentes ao referido fungo. Os dados apresentados mostram a indução de resistência sistêmica adquirida em todas as enzimas avaliadas em plantas jovens. As atividades das proteínas de defesa detectadas, tanto constitutivas quanto induzidas sugerem condições propícias ao desencadeamento do evento de morte celular programada em plantas adultas de soja quando estas se encontram infectadas com o fungo *C.kikuchii*, o que torna a planta susceptível por se tratar de um fungo necrotrófico. Além de indicarem uma estratégia de defesa da planta voltada para a resistência estrutural, devido à possível formação de calose e indícios do aumento da síntese de lignina. Enquanto que em plantas jovens as atividades avaliadas indicam a ação de enzimas degradadoras de paredes celulares de fungos, além de atividades proteásicas importantes no combate ao fitopatógeno.

## 10. REFERÊNCIAS

- ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystain superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933-937, 1992.
- BALBINOT JUNIOR, A. A.; HIRAKURI, M. H.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; RIBEIRO, R. H. Análise da área, produção e produtividade da soja no Brasil em duas décadas (1997-2016). **Boletim de desenvolvimento e pesquisa**, 2017.
- BANANI, H.; SPADARO, D.; ZHANG, D.; MATIC, S.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. **International Journal of Food Microbiology**, v. 183, p. 1-8, 2014.
- BARROS, R. Doenças da cultura da soja. **Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2011/2012**. Mato Grosso do Sul, v. 1, p. 208-221, 2011.
- BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanases. **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**, v. 2, p. 23-30, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAY, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2331-2341, 2004.
- BUSAM, G.; KASSEMAYER, H. H.; MATERN, U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1029–1038, 1997.
- BRIDGES, S. S. Design, synthesis, and evaluation of cysteine proteases inhibitors. **Tese de Doutorado em Química**, Georgia Institute of Technology, 2008.
- CÂMARA, G.M.S. Introdução ao agronegócio da cana. **Cana-de-açúcar, mandioca e soja**, p. 1-28, 2011.
- CARREGAL, L. H.; WEGENER, H.; SILVA, J. R. C. Doenças de final de ciclo: mancha parda e crestamento foliar de cercospora ou mancha púrpura da semente. **Doenças da soja: Melhoramento Genético e Técnicas de Manejo**. Ed. Millennium, Campinas, 2015.
- CASS, L. C.; PERALDI, A.; DOWD, P. F.; MOTTIAR, Y.; SANTORO, N.; KARLEN, S. D.; BUKHMAN, Y. V.; FOSTER, C. E.; THROWER, N.; BRUNO, L. C.; MOSKVIN, O. V.; JOHNSON, E. T.; WILLHOIT, M. E.; PHUTANE, M.; RALPH, J.; MANSFIELD, S. D.; NICOLSON, P.; SEDBROOK, J. C. Effects of phenylalanine ammonia lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 4317–4335, 2015.

CHAMAN, M. E.; COPAJA, S. V.; ARGANDONA, V. H. Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. **Jornaul of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2227–2231, 2003.

CHANDA, A. K.; WARD, N. A.; ROBERTSON, C. L.; CHEN, Z-Y.; SCHNEIDER, R. W. Development of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection Protocol for *Cercospora kikuchii* in Soybean Leaves and Its Use for Documenting Latent Infection as Affected by Fungicide Applications. **Phytopathology**, v. 104, p. 1118-1124, 2014.

CHEN, Y. X.; KIM, J. Y. Callose synthesis in higher plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, p. 489-492, 2009.

CLETUS, J.; BALASUBRAMANIAN, V.; VASHISHT, D.; SAKTHIVEL, N. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 1719–1732, 2013.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira grãos, v. 5 Safra 2017/18 - Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-114, Outubro 2017. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 09 de Out. 2017.

COSTA, I. F. D.; BALARDIN, R. S.; MEDEIROS, L. A.; BAYER, T. M. Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1684-1688, 2006.

DAUB, M. E.; BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. **Plant Physiology**, Glasgow, Reino Unido, v. 7, p. 763-766, 1983.

DONG, Y.S.; ZHAO, B.L.; WANG, Z.W.; JIN, Z.Q.; SUN, H. The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 931-936, 2004.

D'SILVA, I.; POIRIER, G. G.; HEATH, M. C. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response--a form of programmed cell death. **Experimental cell research**, v. 245, p. 389-399, 1998.

EL-SHORA, H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. **Plant Science**, 162, 1-7, 2002.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95489/1/SP-16-online.pdf>>. Acesso em: 11 Out. 2017.

EHRENSHAFT, M.; UPCHURCH, R. G. Host proteins induces accumulation of the toxin cercosporin and mRNA in a phytopathogenic strain of *Cercospora kikuchii*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p. 95-107, 1993.

ERLANGER, B. F.; KOLOWSKY, M.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, 1961.

FAIZE, M.; BURGOS, L.; FAIZE, L.; PETRI, C.; BARBA-ESPIN, G.; DÍAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; ALBURQUERQUE, N.; HERNANDEZ, J. A. Modulation of tobacco bacterial disease resistance using cytosolic ascorbate peroxidase and CuZn-superoxide dismutase. **Plant Pathology**, v. 61, p. 858–866, 2012.

FAN, S.; WU, G. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 273-292, 2005.

FOYER, C.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 7. ed. Rio de Janeiro, **Athenen**, 1986. p. 145.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1-12, 2011.

FRY, S. C. Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, v.37, p. 165 – 186, 1986.

FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. F. Correlação entre digestibilidade *in vitro* da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 302-309, 2001.

GAO, Y; GUO, Y. K.; LIN, S. H.; FANG, Y. Y.; BAI, J. G. Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heatstressed cucumber leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 126, p. 20-26, 2010.

GARDNER, M. W. Indiana plant diseases. **The Proceedings of the Indiana Academy of Science**, v. 35, p. 237-257, 1925.

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

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HELLER, J.; TUDZYNSKI, P. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 369-390, 2011.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, v. 42, p. 462-468, 2001.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station** v.C347, p.139, 1950.

IGNATIUS, S. M. J.; CHOPRA, R. K.; MUTHUKRISHNAN, S. Effects of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases in near-isogenic lines of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 90, p. 584–592, 1994.

KAPUR, R.; TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Isolation and partial characterization of a subtilisin inhibitor from the mung bean (*Vigna radiata*). **Plant Physiology**, v. 91, p. 106–112, 1989.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 713–721, 1993.

KRÜGER, J.; THOMAS, C. M.; GOLSTEIN, C.; DIXON, M. S.; SMOKER, M.; TANG, S.; MULDER, L.; JONES, J. D. A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. **Science**, v. 296, p. 744–747, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 679–685, 1970.

LANDIM, P. G. C.; CORREIA, T. O.; SILVA, F. D. A.; NEPOMUCENO, D. R.; COSTA, H. P. S.; PEREIRA, H. M.; LOBO, M. D. P.; MORENO, F. B. M. B.; BRANDÃO-NETO, J.; MEDEIROS, S. C.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; SOUSA, B. L.; BARROSO-NETO, I. L.; FREIRE, V. N.; CARVALHO, C. P. S.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; GRANGEIRO, T. B. Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. **Biochimie**, v. 135, p. 89–103, 2017.

LAWTON, M. A.; DIXON, R. A.; HAHLBROCK, K.; LAMB, C. Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 129, p. 593–601, 1983.

LESHEM, Y.Y. Plant senescence processes and free radicals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 5, p. 39–49, 1988.

LEUBNER-METZGER, G.; MEINS JR., F. Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2). **Pathogenesis-related proteins in plants**, p. 49–76, 1999.

MATSUMOTO, T.; TOMAYASU, R. Studies on the purple speck of soybean seed. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 1, p. 1–14, 1925.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, v. 586, p. 585–595, 2012.

MISAS-VILLAMIL, J. C.; VAN DER HOORN, R. A. L.; DOEHLEMAN, G. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. **New Phytologist**, v. 212, p. 902–907, 2016.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 323–328, 2001.



NASCIMENTO, K. J. T.; DEBONA, D.; FRANÇA, S. K. S.; GONÇALVES, M. G. M.; DAMATTA, F. M.; RODRIGUES, F. A. Soybean resistance to *Cercospora sojina* infection is not enhanced by silicon. **Phytopathology**, v. 104, p. 1183-1191, 2014.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. Proteolytic enzymes - a practical approach. **Oxford: JRL Press**, v. 2, p.259, 1990.

NILCHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369–389, 1992.

NYOCHEMBENG, L. M.; BEYL, C. A. Induction and characterization of pathogenesis-related proteins in roots of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* [L] Schott) infected with *Pythium myriotylum*. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 212-221, 2015.

OLIVEIRA, J. T. A.; BARRETO, A. L. H.; VASCONCELOS, I. M.; ELOY, Y. R. G.; GONDIM, D. M. F.; FERNANDES, C. F.; FREIRE-FILHO, F. R. Role of antioxidante enzymes, hydrogen peroxide and PR- proteins in the compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes with the fungus *Colletotrichum gloesporioides*. **Journal Plant Physiology and Pathology**, v. 2, p. 1-8, 2014.

OLIVEIRA, H. P.; SILVA, R. G. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; SOUSA, D. O. B.; PEREIRA, M. L.; SOUZA, P. F. N.; SOARES, A. A.; GOMES, V. M.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MORENO, F. B. M. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel peroxidase purified from *Marsdenia megalantha* latex inhibits phytopathogenic fungi mediated by cell membrane permeabilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 743-753, 2017.

OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **The Plant Cell Online**, v. 13, p. 179-191, 2001.

PENHA, L. A. O.; FONSECA, I. C. B.; MANDARINO, J.M.; BENASSI, V. T. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, p. 91-102, 2007.

PARK, Y.K; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil-β-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosadas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, p. 130-135, 2002.

- RAES, J; ROHDE, A; CHRISTENSEN, J. H; VAN DE PEER, Y; BOERJAN, W. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1051-1071, 2003.
- RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; GOMES, M. T. R.; FREITAS, C. D. T.; CARVALHO, C. P. S.; JÚNIOR, P. A. V. R.; SALAS, C. E. A. Phytopathogenic Cysteine Peptidase from Latex of Wild Rubber Vine *Cryptostegia grandiflora*. **Protein Journal**, v. 33, p. 199–209, 2014
- REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.
- RICHARDSON, M. The protease inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**, v. 16, p. 159–169, 1977.
- RODRIGUES, M. A. T. Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura de soja. **Tese de Doutorado em Fitotecnia**, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2009.
- ROJO, E.; MARTÍN, R.; CARTER, C.; ZOUHAR, J.; PAN, S.; PLOTNIKOVA, J.; JIN, H.; PANEQUE, M.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; BAKER, B.; AUSUBEL, F. M.; RAIKHEL, N. V. VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. **Current Biology**, v. 14, p. 1897–1906, 2004.
- ROMERO-PUERTAS, M. C.; SANDALIO, L. M. Nitric oxide level is self-regulating and also regulates its ROS partners. **Frontiers in plant Science**, v. 7, n. 316, p. 1-5, 2016.
- ROULIN, S.; BUCHALA, A. J. The induction of  $\beta$ -1,3-glucanases and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 471-489, 1995.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CARVALHO, J. B.; BONALDO, S. M.; CRUZ, M. E. S.; CARLOS, M. M.; STANGARLIN, J. R. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, p. 88-93, 2008.
- SHARMA, K. Protease inhibitors in crop protection from insects. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 3, p. 55-70, 2015.
- SILVA, R. G. G.; VASCONCELOS, I. M.; FILHO, A. J. U. B.; CARVALHO, A. F. U.; SOUZA, T. M.; GONDIM, D. M. F.; VARELA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. T. A. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 48-55, 2015.
- STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, p. 18-46, 2011.
- SUZUKI, S.; YUYAMA, M. M.; CAMACHO, S. A. Boletim de Pesquisa de Soja 2006. Rondonópolis: Fundação MT, p. 228, 2006.

- TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na interação plantamicroorganismo. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 373-386.
- UBHAYASEKERA, W. Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. **Polymer International**, v. 60, p. 890-896, 2011.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 31, p. 43-50, 1991.
- VAN DER HOORN, R. A. L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 191 – 223, 2008.
- VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.
- VAN ROSSUM M. W. P. C.; ALBERDA M.; VAN DER PLAS L. H. W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, v. 130, p.207–216, 1997.
- VARELA, A. L. N.; KOMATSU, S.; WANG, X.; SILVA, R. G. G.; SOUZA, P. F. N.; LOBO, A. K. M.; VASCONCELOS, I. M. SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Gel-free/label-free proteomic, photosynthetic, and biochemical analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) resistance against Cowpea Severe Mosaic Virus (CPSMV). **Journal of Proteomics**, v. 163, p. 76-91, 2017.
- XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P.; ARY, M. B.; SILVA, C. P.; CARVALHO, M. M. M.; MACEDO, M. L. R.; LEMOS, F. J. A.; GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in some seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1139-1143, 1989.
- XUE, H.Q.; UPCHURCH, R.G.; KWANYUEN, P. Ergosterol as a quantifiable biomass marker for *Diaporthe phaseolorum* and *Cercospora kikuchii*. **Plant Diseases**, v. 90, p. 1395-1398, 2006.
- WALTERS, H. J. Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease**, v. 64, p. 961-962, 1980.
- WEGENER, C. S.; BARTLING, S.; OLSEN, O.; WEBER, J.; VON WERSTEIN, D. Pectate lyase in transgenic potatoes confers pre-activation of defence against *Erwinia carotovora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 359–376, 1996.
- WENDEHENNE, D.; Q-M GAO; KACHROO, A.; KACHROO, P. Free radical-mediated systemic immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 20, p. 127–134, 2014.