

**ASPECTOS ESTRUTURAIS DA TOXINA DA SOJA (SBTX) E SUA
PARTICIPAÇÃO NA DEFESA VEGETAL**

JANNE KEILA SOUSA MORAIS

FORTALEZA-CEARÁ

2007

**ASPECTOS ESTRUTURAIS DA TOXINA DA SOJA (SBTX) E SUA
PARTICIPAÇÃO NA DEFESA VEGETAL**

JANNE KEILA SOUSA MORAIS

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
BIOQUÍMICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA-CE

ABRIL-2007

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Janne Keila Sousa Morais

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: _____

Dr. Fábio Rossi Cavalcanti
Examinador
Universidade Federal do Piauí

Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Examinador
Universidade Federal do Ceará

Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Orientadora
Universidade Federal do Ceará

Ao criador **Deus**,
A minha querida **mãe**,
A minha **irmã**,
A minha **avó**,
dedico com imensa gratidão.

“Feliz é a pessoa que é capaz de discernir o significado das coisas”.

Virgil

AGRADECIMENTOS

A Dra. **Ilka** Maria Vasconcelos, pela criteriosa orientação, dedicação, carinho, compreensão e confiança durante a realização desta dissertação, além de ensinamentos fundamentais, conferindo a cada dia, maturidade à minha carreira científica.

Ao Dr. José **Tadeu** Abreu de Oliveira, por sua constante contribuição para a execução deste trabalho e por sua incansável e agradável transmissão dos conhecimentos científicos, fruto de sua sede do saber.

Ao Dr. **Fábio** Rossi Cavalcanti pela pronta disponibilidade em aceitar participar da banca examinadora, bem como pelas sugestões que contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.

A Dra. **Valdirene** Moreira Gomes, pelos experimentos com as leveduras.

A Dra. **Leila** Maria Beltramini, pela análise de dicroísmo circular.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na pessoa do pesquisador **André** Luís Lourenção, pelo fornecimento das sementes de soja utilizadas neste trabalho.

Aos colegas **Cléverson, Jefferson, Camila, Juliana Brasil, Thiago, Emanuel, Ygor, Edvar, Simone, Hélio, Mayra, Betânia, Hévila, Carlos Eduardo, Luana**, pelo apoio e companheirismo sempre prestados e, de forma especial, ao **Fábio César** e **Abdul**, pelo carinho e amizade.

Aos amigos **Daniele, Elisângela, Andréa, Geórgia, Rosana, Fernanda, Juliana, Sílvia, Isabel, Lúcia, Cláudio, Jandenilson, Emanuele, Hellen, Eveline, Mirela, Nathália, Hermógenes e Henrique**, que com a amizade e convivência alegre tornaram tão agradável minha caminhada no Laboratório de Toxinas Vegetais.

De forma especial, agradeço o companheirismo e esforço empenhado pelos meus grandes amigos **Carla, Dráulio, Michella e Ricristhi** que ao meu lado estiveram, principalmente, nos momentos finais de elaboração deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), pelos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos.

Com carinho, agradeço à minha avó, **Antonieta**, que sempre me apoiou durante todos os momentos de minha vida.

Enfim, agradeço a **DEUS** pelo dom da vida e, de maneira muito especial, a minha querida **mãe** e a minha **irmã**, pelo inestimável amor e estímulo diário que me proporcionaram com suas palavras de incentivo, me dando força para viver as conquistas que faço em minha vida.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através da concessão de bolsa de Pós-Graduação à autora deste trabalho e de auxílio à pesquisa através dos Projetos de Pesquisa: 1) *Moringa oleifera*: Uma Fonte Alternativa de Proteínas como Aditivo em Ração em Substituição ao Milho e/ou Soja no Setor Produtivo Avícola (Nº do Processo: 503426/2003-2 CT-Agronegócio/MCT/CNPq/MESA 01/2003); 2) Recuperação e Otimização da Infra-Estrutura do Laboratório de Toxinas Vegetais (Nº do Processo: 412497/2003-4 CNPq); 3) Bioquímica, Biologia Molecular e Fisiologia de Plantas (Nº do Processo: 620231/2004-1 MCT/CNPq/PADCT) e 4) Prospecção de Peptídeos/Proteínas de Plantas Nativas e Cultivadas do Nordeste Brasileiro com Potencial Biotecnológico no Controle de Pragas e Doenças Agrícolas (Nº do Processo: 301086/2006-0).

Banco do Nordeste (BNB), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa “Genômica Funcional, Estrutural e Comparativa do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*)” (MCT/BNB, Programa RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xv
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xvi
<u>RESUMO</u>	xvii
<u>ABSTRACT</u>	xviii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - FUNDAMENTAÇÕES TEÓRICAS	4
2.1 - <u>Evolução e Limitações da Cultura da Soja [<i>Glycine Max</i> (L.) Merr.] no Brasil</u>	5
2.2 - <u>Doenças Fúngicas da Soja</u>	8
2.3 - <u>Defesa Vegetal</u>	10
2.3.1 - Elicitores e a indução de respostas de defesa	11
2.3.1.1 - Ácido Jasmônico como Elicitor de Respostas de Defesa Vegetal	12
2.4 - <u>Proteínas Antifúngicas</u>	14
2.4.1 - Proteínas Antifúngicas que Atuam na Parede Celular	15
2.4.2 - Proteínas Antifúngicas que Atuam na Membrana Celular	16
2.4.3 - Proteínas Antifúngicas que Atuam em Alvos Intracelulares	17
2.5 - <u>Toxinas da Soja</u>	18
3 - OBJETIVOS	20
3.1 - <u>Objetivo Geral</u>	21
3.2 - <u>Objetivos Específicos</u>	21
4 - MATERIAIS	22
4.1 - <u>Sementes</u>	23

4.2 - <u>Animais de Experimentação</u>	23
4.2.1 - Camundongos	23
4.2.2 - Coelho	23
4.3 - <u>Fungos</u>	24
4.3.1 - Fungos Filamentosos	24
4.3.2 - Fungos Levuriformes	24
4.4 - <u>Reagentes Químicos</u>	24
5 - MÉTODOS	26
5.1 - <u>Preparações da Farinha de Sementes</u>	27
5.1.1 - Obtenção da Farinha	27
5.1.2 - Delipidação da Farinha	27
5.2 - <u>Determinação de Proteína</u>	27
5.3 - <u>Detecção e Quantificação da Toxina</u>	28
5.4 - <u>Purificação da Toxina da Soja (SBTX)</u>	28
5.4.1 - Extração e Fracionamento com Sulfato de Amônio	28
5.4.2 - Cromatografias	30
5.5 - <u>Caracterizações Físico-químicas e Estruturais da SBTX</u>	32
5.5.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	33
5.5.2 - Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH ₂ -Terminal	34
5.5.3 - Espectro de Fluorescência	34
5.5.4 - Estrutura Secundária Estimada por Dicroísmo Circular (CD)	35
5.6 - <u>Avaliação da Atividade Antifúngica da SBTX</u>	35
5.6.1 - Cultivo dos Fungos Filamentosos	35
5.6.2 - Obtenção dos Esporos	36
5.6.3 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Esporos	36
5.6.4 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade da	37

Membrana de Esporos	
5.6.5 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Vesículas Fosfolipídicas	37
5.6.6 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido	38
5.6.7 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras	39
5.6.8 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras	39
5.7 - <u>Avaliação da Indução da SBTX por Ácido Jasmônico</u>	40
5.7.1 - Esterilização das Sementes	40
5.7.2 - Tratamento das Sementes com Ácido Jasmônico	40
5.7.3 - Preparação do Extrato Bruto	40
5.7.4 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	41
5.7.5 - Ensaio Imunológicos	41
5.8 - <u>Análise Estatística</u>	45
6 - RESULTADOS	46
PARTE 1 – Purificação e Aspectos da Estrutura Primária e Secundária da Toxina da Soja (SBTX)	48
6.1 - <u>Seleção do Genótipo</u>	48
6.2 - <u>Extração e Purificação da SBTX</u>	48
6.3 - <u>Avaliação da Massa Molecular e Separação das Subunidades da SBTX</u>	51
6.4 - <u>Determinação da Seqüência NH₂-Terminal</u>	54
6.5 - <u>Estrutura Secundária Estimada por Dicroísmo Circular</u>	56
PARTE 2 - Avaliação do Potencial Antifúngico de SBTX	56
6.6 - <u>Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Esporos</u>	56
6.7 - <u>Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade da</u>	63

<u>Membrana de Esporos</u>	
6.8 - <u>Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Vesículas Fosfolipídicas</u>	63
6.9 - <u>Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido</u>	63
6.10 - <u>Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras</u>	70
6.11 - <u>Microscopia Eletrônica de Varredura</u>	70
6.12 - <u>Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras</u>	70
PARTE 3 - Avaliação da Indução da SBTX por Ácido Jasmônico	75
6.13 - <u>Avaliação da Morfologia de Sementes de Soja Após Tratamento com Ácido Jasmônico</u>	75
6.14 - <u>PAGE dos Extratos de Sementes de Soja Submetidas ao Tratamento com Ácido Jasmônico</u>	75
6.15 - <u>Quantificação da SBTX nas Sementes de Soja Submetidas ao Tratamento com Ácido Jasmônico por ELISA</u>	76
6.16 - <u>Tissue print</u>	82
7- DISCUSSÃO	84
8- CONCLUSÃO	92
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 - <i>Glycine max</i> (L.) Merr. Aspectos da planta, vagem e sementes	6
2 - Representação do ácido jasmônico, quando R é um hidrogênio, e do metil jasmonato, quando R é um grupamento metil	13
3 - Esquema de obtenção do extrato total	29
4 - Esquema geral de purificação da toxina da soja (SBTX)	31
5 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose	49
6 - Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose	50
7 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30	52
8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença e ausência de β -mercaptoetanol, da toxina da soja (SBTX).	53
9 - Espectro de fluorescência da SBTX	57
10 - Espectro de dicroísmo circular da SBTX	58
11 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de <i>Aspergillus niger</i> incubados com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e com SBTX	59
12 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de <i>Penicillium herguei</i> com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e com SBTX	60
13 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de <i>Fusarium oxysporum</i> com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e com SBTX	61
14 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de	62

esporos de <i>Fusarium solani</i> com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e com SBTX	
15 - Ensaio de permeabilidade de membrana celular de esporos do fungo <i>Aspergillus niger</i> por SBTX	64
16 - Permeabilização de vesículas unilamelares por SBTX	65
17 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de <i>Aspergillus niger</i> por SBTX	66
18 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de <i>Penicillium herguei</i> por SBTX	67
19 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de <i>Fusarium solani</i> por SBTX	68
20 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de <i>Fusarium oxysporum</i> por SBTX	69
21 - Teste de inibição do crescimento da levedura <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	71
22 - Teste de inibição do crescimento da levedura <i>Candida albicans</i>	72
23 - Teste de inibição do crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	73
24 - Células de leveduras incubadas com SBTX, visualizadas em microscópio eletrônico de varredura	74
25 - Sementes de soja embebidas em água grau milli-Q, etanol 0,05% e ácido jasmônico 30 e 50 μ M, por 0, 12 e 24 h	77
26 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS 1% e β -mercaptoetanol 1% de extratos totais de sementes de soja embebidas em H ₂ O grau Milli-Q e etanol 0,05%	78
27 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS 1% e β -mercaptoetanol 1% de extratos totais de sementes de soja embebidas em ácido jasmônico 30 e 50 μ M	79

28 -	Imagens tridimensionais de PAGE-SDS dos extratos totais de sementes de soja embebidas em água grau milli-Q, etanol 0,05% e ácido jasmônico 30 e 50 μ M, por 0, 12 e 24 h	80
29 -	Teores de SBTX em extratos totais de sementes embebidas em água grau milli-Q, etanol 0,05% e ácido jasmônico 30 e 50 μ M, por 0, 12 e 24 h, detectados por ELISA, usando IgG anti-SBTX	81
30 -	<i>Tissue print</i> de sementes de soja embebidas em ácido jasmônico 50 μ M, por 24 h	83

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 - Prognóstico da produção agrícola nacional, para a safra de 2007, dos principais produtos agrícolas	7
2 - Principais doenças fúngicas da soja e parte da planta agredida	9
3 - Alinhamento da seqüência NH ₂ -terminal da SBTX com outras proteínas vegetais apresentando seqüências similares	55

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BSA	Albumina Sérica Bovina
CM	Carboximetil
CNPSo	Centro Nacional de Pesquisa da Soja
CNTX	Canatoxina
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DEAE	Dietilaminoetil
DL ₅₀	Dose capaz de matar 50% dos animais testados
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GlcNac	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
GCEA	Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias
IAC	Instituto Agrônômico de Campinas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
JA	Ácido Jasmônico
JIPs	Proteínas Induzidas por Jasmonato
NBT/BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium
PVDF	Difluoreto polivinilideno
RIPs	Proteínas Inativadoras de Ribossomos
SBA	Aglutinina de soja
SBTI	Inibidores de Tripsina de Soja
SBTX	Toxina da soja
SYTX	Soyatoxina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - tetrametiletilenodiamina
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Tween	Polioxietileno sorbital mono-oleato

RESUMO

Este trabalho descreve a caracterização estrutural da toxina de soja (SBTX), isolada de sementes por Siebra (2004), e discute o envolvimento desta proteína na defesa da planta contra patógenos. A SBTX foi purificada por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (20-55%) e cromatografias de troca iônica e filtração em gel. Por PAGE-SDS, SBTX apresentou massa molecular aparente de 44 kDa, originando duas subunidades, uma de 27 kDa e outra de 17 kDa, quando tratada com 5% de β -mercaptoetanol por 15 minutos. A proteína intacta (44 kDa) e a subunidade de 27 kDa apresentaram a mesma seqüência NH₂-terminal ADPTFGFTPLGLSEKANLQIMKAYD. Já a subunidade de 17 kDa mostrou uma outra seqüência NH₂-terminal, representada por PNPKVFFDMTIGGSAGRIVMEEYA. Por espectroscopia de fluorescência, foi observado que a excitação de uma solução aquosa de SBTX, a 280 nm, provocou emissão máxima a 332 nm, que é típico da contribuição de resíduos de triptofano enterrados no interior da molécula. A análise da estrutura secundária da SBTX por dicroísmo circular classificou esta toxina como pertencente à classe alfa e beta, apresentando 35% de α -hélice, 13% de fitas e folhas β , 27% de volta- β , 25% de estrutura não ordenada e 1% de resíduos aromáticos e pontes dissulfeto. SBTX (0,05 μ gP/ μ L) inibiu a germinação dos esporos dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Penicillium herguei*, mas não teve ação sobre *Fusarium solani* e *F. oxysporum*, mesmo em concentração dez vezes maior. Todavia, essa toxina não interferiu no crescimento de hifas de nenhum dos fungos citados. Por outro lado, a SBTX retardou o crescimento das leveduras *Candida albicans* e *Kluyveromyces marxianus*, mas não de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo ser o seu efeito espécie-específico. O mecanismo pela qual a SBTX atua parece não estar relacionado com alteração da permeabilidade da membrana plasmática. O tratamento das sementes de soja com ácido jasmônico 50 μ M, por 24 h, induziu aumento expressivo no conteúdo de SBTX. Os resultados obtidos sugerem que SBTX pode ter um papel na estratégia de defesa vegetal contra patógenos.

ABSTRACT

This work describes the structural characterization of the soybean toxin (SBTX), isolated from seeds by Siebra (2004). In addition, it is discussed the involvement of this protein in plant defense against pathogens. SBTX was isolated using ammonium sulfate fractionation (20-55%), ion exchange and gel filtration chromatographies. Judging by the SDS-PAGE patterns, it was reported to SBTX an apparent molecular mass of 44 kDa, composed of subunits of 27 kDa and 17 kDa, both linked by disulfide bond. NH₂-terminal sequencing of electroblotted samples showed that 44 and 27 kDa bands possess identical NH₂-terminal amino acid sequences, ADPTFGFTPLGLSEKANLQIMKAYD that differs from that of the 17 kDa band, PNPKVFFDMTIGGQSAGRIVMEEYA. In the fluorescence spectroscopy, excitation of the toxin solution at 280 nm gave a maximum emission in 332 nm, which is typically for tryptophan residues buried inside the protein. The secondary structure of SBTX by circular dichroism classified this protein as belonging to alpha- and beta class, showing 35% α -helix, 13% β -sheet and strand, 27% β -turn, 25% random coil and 1% aromatic residues and disulfide bonds. SBTX (50 μ gP/mL) inhibited the spore germination of the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium hergueli*, but did not inhibit those of *Fusarium solani* e *F. oxysporum*, even at concentrations ten times higher. Nevertheless, SBTX did not interfere in the vegetative growth of the fungus cited above. On the other hand, SBTX slowed the growth of the yeasts *Candida albicans* and *Kluyveromyces marxianus*, but did not have effect on *Saccharomyces cerevisiae*, suggesting that its effect would be species-specific. The mechanism by which SBTX acts seems to be not related to alteration of the plasmatic membrane permeability. The treatment of soybean seeds with 50 μ M jasmonic acid, for 24 h, led to remarkable increase in SBTX content. The results suggest that SBTX may have a role in the plant defense strategy against pathogens.

1. INTRODUÇÃO



A população global excedeu seis bilhões de habitantes em 2000 e as projeções para 2025 e 2050 são de, aproximadamente, 7,8 e 9 bilhões, respectivamente (FAO, 2006). O aumento populacional ressaltado requer uma produção agrícola adicional de cerca de 2 bilhões de toneladas por ano, representando 230 milhões de toneladas de proteínas (BABU *et al.*, 2003; FAO, 2006). Esse adicional na produção depende, primariamente, do incremento da produtividade agrícola, devendo ser feito de maneira economicamente viável e ambientalmente sustentável (GATEHOUSE, 2002).

Uma das estratégias para alcançar esse aumento na produção de alimentos está diretamente relacionada, pelo menos em parte, ao controle mais eficiente nas perdas provenientes de agentes bióticos (herbívoros, fitopatógenos e ervas daninhas), as quais são estimadas como sendo de 38 a 42% da produção potencial (AGRIOS, 1997; FAO, 2006). Os métodos de controle atualmente empregados dependem, basicamente, do uso de defensivos agrícolas dentro de um manejo integrado de pragas. Entretanto, há uma demanda crescente por uma agricultura limpa, com menor uso de energia e produtos químicos, a fim de evitar a presença de resíduos indesejáveis no meio ambiente e nos alimentos, além de reduzir as contaminações aos agricultores. É dentro deste contexto que as plantas se sobressaem, como um repositório de substâncias constitutivas e/ou induzidas, dotadas de diferentes atividades, conferindo resistência à infecção por vírus, fungos, nematóides e bactérias e, também, a herbivoria praticada por insetos, pássaros e outros animais, dentre eles o homem (VASCONCELOS *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2005a,b; WANG e NG, 2006a,b).

Em consonância com o que foi exposto, é que uma proteína tóxica (44 kDa) isolada de sementes de soja, conhecida como toxina da soja (SBTX), foi selecionada para estudo neste trabalho. A SBTX foi escolhida por se tratar de uma proteína descoberta recentemente por nosso grupo de pesquisa (SIEBRA, 2004), ainda carente de informações referentes às suas propriedades estruturais e papel fisiológico. Estudos anteriores mostraram que a SBTX possui ação neurotóxica para camundongos, tendo sido capaz, também, de inibir o crescimento do fungo *Cercospora sojina* e de exercer efeitos tóxicos aos insetos *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus*, sugerindo o seu envolvimento na defesa vegetal contra agressores. Foi dentro desse escopo que as atividades foram aqui desenvolvidas, tendo como eixo os seguintes questionamentos:

- 1. Informações referentes à seqüência NH₂-terminal e à estrutura secundária da SBTX possibilitariam uma melhor compreensão de seu papel fisiológico?*
- 2. A SBTX seria ativa contra outras espécies de fungos fitopatogênicos, além do Cercospora sojina? Se positivo, em que etapa do desenvolvimento do fungo a SBTX estaria atuando e qual mecanismo de ação estaria envolvido?*
- 3. Havendo evidências anteriores de que a SBTX se apresenta como um dos integrantes do arsenal de defesa da soja, seria esta proteína induzida através do tratamento das sementes com ácido jasmônico?*

Para responder aos questionamentos citados, várias abordagens experimentais foram desenvolvidas, com ênfase nos aspectos estruturais da SBTX e em seus efeitos frente a diferentes espécies de fungos fitopatogênicos. Além disso, foi avaliada a indução da SBTX pelo tratamento das sementes com ácido jasmônico. O nosso entendimento é que o conhecimento das propriedades moleculares, das atividades biológicas e mecanismos de ação da SBTX é uma etapa imprescindível para o seu aproveitamento biotecnológico, podendo se constituir em uma excelente ferramenta aplicável em várias áreas de pesquisa, inclusive como uma molécula que poderá ser aproveitada para o melhoramento de culturas de interesse, através da engenharia genética, ou que quando aplicada diretamente nas plantas possa induzir respostas de defesa ou tolerância aos estresses ambientais, tudo isso trazendo benefícios sociais, econômicos e ecológicos de amplo alcance.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - Evolução e Limitações da Cultura da Soja [*Glycine Max* (L.) Merr.] no Brasil

Dentre as espécies vegetais cultivadas de maior importância econômica e social para o Brasil, a soja (FIGURA 1), sem dúvida alguma, é a que mais se destaca, devido ao seu potencial produtivo, a sua composição química e ao seu valor nutritivo, conferindo a esta leguminosa multiplicidade de aplicações na alimentação humana e/ou animal, com relevante papel sócio-econômico, além de se constituir em matéria prima indispensável para impulsionar diversos complexos agroindustriais (EMBRAPA, 2007).

Atualmente, o Brasil é responsável por 20% da produção mundial de soja, sendo o segundo maior produtor dessa oleaginosa, perdendo apenas para os Estados Unidos, que participa com 46% da produção mundial (CONAB, 2006).

A expansão do cultivo da soja no Brasil teve início no final dos anos sessenta, tornando-se, em um curto período de tempo, um dos principais produtos da exploração agrícola e da economia nacional. Desde o início da produção comercial até a safra de 2005/2006, a área cultivada nacional passou de 702 para 22.229,3 mil hectares, a produção de 457 para 53.413,9 mil toneladas e a produtividade média de 651 para 2.403 Kg/ha (BONATO e BONATO, 1987; CONAB, 2006). Entretanto, o IBGE realizou em dezembro de 2006 o segundo prognóstico das áreas plantadas ou a plantar (TABELA 1). Dentre os cinco produtos que tiveram variação negativa, a soja apresentou maior redução na área plantada. A área cultivada com soja na safra de 2006/2007 será de 20,3 milhões de hectares, 1,6 milhões (7,4%) inferior à de 2005/06.

Dentre os principais fatores envolvidos nessa redução e que, portanto, limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Aproximadamente, 50 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, já foram identificadas no Brasil. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças estão estimadas em cerca de 15% a 20%. Entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA, 2007).



FIGURA 1 - *Glycine max* (L.) Merr. Aspectos da planta, vagem e sementes.

TABELA 1 - Prognóstico da produção agrícola nacional, para a safra de 2007, dos principais produtos agrícolas

Produtos Agrícolas	Safra 2006		Área (ha)		Variação (%)	
	Plantada (2)	Colhida (3)	Safra 2007		(4/2)	(4/3)
			Plantada ou a plantar (4)			
Algodão (em caroço)	910 854	898 650	1 028 936		13,0	14,5
Amendoim (em casca) 1ª safra	78 223	78 213	73 162		-6,5	-6,5
Arroz (em casca)	2 999 681	2 969 290	2 972 370		-0,9	0,1
Batata-inglesa 1ª safra	67 845	67 828	70 666		4,2	4,2
Cana-de-açúcar (1)	7 038 357	6 185 681	6 493 569		..	5,0
Cebola	57 293	57 273	58 741		2,5	2,6
Feijão (em grão) 1ª safra	2 322 817	2 144 786	2 441 963		5,1	13,9
Fumo (em folha)	500 234	498 016	473 396		-5,4	-4,9
Mandioca (1)	2 405 552	1 874 198	1 922 717		..	2,6
Milho (em grão) 1ª safra	9 616 111	9 281 302	9 302 985		-3,3	0,2
Soja (em grão)	21 994 243	21 958 076	20 279 311		-7,8	-7,6
Total	47 991 210	46 013 313	45 117 816		..	-1,9

Fonte:

IBGE

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa0220070>

> Acesso em 10 jan.2007.

2.2 - Doenças Fúngicas da Soja

A soja está sujeita às doenças causadas por fungos praticamente em todos os seus órgãos (TABELA 2). Nas sementes, o fungo *Cercospora kikuchii* causa a mancha púrpura, reduzindo a qualidade e a germinação. *Phomopsis spp* causa seca nas vagens e nas hastes, uma das doenças mais tradicionais da soja e, anualmente, junto com a antracnose, é responsável pelo descarte de grande número de lotes de sementes. Nas raízes, somente o fungo *Rhizoctonia solani* causa a podridão da raiz e da base da haste, morte em reboleira e tombamento de rizoctonia (EMBRAPA, 2007).

F. solani causa a podridão vermelha da raiz e a incidência dessa doença nas safras de 1996/97, por exemplo, atingiu níveis de 100%, quando avaliada a percentagem de plantas mortas ou raízes atacadas, com perdas variando de insignificantes a mais de 30% (YIORINORI e HIROMOTO, 1998). Nas folhas, a ferrugem asiática, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, é considerada, atualmente, a doença mais temida no mundo todo. A doença é caracterizada por um rápido amarelecimento ou bronzeamento e queda prematura das folhas (EMBRAPA, 2007). No Brasil, a ferrugem asiática causou reduções de produtividade de até 70%, quando áreas tratadas e não tratadas com fungicidas foram comparadas entre si. O custo necessário para o controle da doença no país, estimado no período de 2002 a 2006, atingiu, aproximadamente, 7,7 bilhões de dólares (IBGE, 2006).

As principais medidas de controle para essas doenças incluem a utilização de cultivares resistentes, um sistema integrado de manejo de culturas e a aplicação de fungicidas (EMBRAPA, 2007). No entanto, essas medidas possuem suas limitações. Por exemplo, para um grande número de doenças fúngicas não existem cultivares resistentes ou o número de cultivares é limitado. Ademais, os fungicidas apresentam toxicidade residual alta e aguda, e longos períodos de degradação, sendo, portanto, perigosos tanto à saúde humana como ao meio ambiente (JANISICWICK e KORSTEN, 2002; UNNIKISHNAN e NATH, 2002; TRIPATHI e DUBEY, 2004). Sendo assim, a busca de medidas alternativas para reduzir ou amenizar essas doenças, sem, contudo agredir o meio ambiente, torna-se extremamente importante.

TABELA 2 - Principais doenças fúngicas da soja e parte da planta agredida

Nome Científico do Fungo	Nome Popular da Doença	Parte da Planta Infectada
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Antracnose	Haste, vagem e semente
<i>Phomopsis</i> spp.	Seca da haste e da vagem	Haste e vagem
<i>Fusarium</i> spp.	Seca da vagem	Vagem
<i>Rhizoctonia solani</i>	Tombamento de rizoctonia	Raiz
<i>Rhizoctonia solani</i>	Morte em reboleira	Raiz
<i>Rhizoctonia solani</i>	Podridão da raiz e da base da haste	Raiz
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Ferrugem asiática	Folhas
<i>Cercospora kikuchii</i>	Crestamento foliar de cercóspora	Folhas
<i>Cercospora sojina</i>	Mancha do olho-de-rã	Folhas

Fonte: EMBRAPA <http://www.cnpso.embrapa.br/download/tpsoja_2007.pdf>
Acesso em 10 jan.2007.

2.3 - Defesa Vegetal

As plantas possuem mecanismos de defesa para conter o ataque do patógeno. Esses mecanismos podem ser passivos ou pré-existentes envolvendo barreiras estruturais, tais como ceras, celulose, calose, cutina, lignina, pêlos, espinhos e tricomas (AGRIOS, 1996; MENEZES e JARED, 2002; LIPKA e PANSTRUGA, 2005).

Plantas também possuem respostas de defesa ativas que freqüentemente incluem uma rápida morte celular programada, conhecida como resposta hipersensitiva (HR), a geração de espécies reativas de oxigênio, a ativação de genes de defesa, e a produção de fitoalexinas (DANGL e JONES, 2001; DIXON, 2001; LAM *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2003; GREENBERG e YAO, 2004; TORRES e DANGL, 2005; FERNANDES *et al.*, 2006; BOCCARA *et al.*, 2007). Em adição a essas respostas locais, partes da planta não infectadas usualmente desenvolvem resistência sistêmica adquirida, que é caracterizada pela ativação sistêmica de várias classes de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e pelo desenvolvimento de uma resistência prolongada a infecções causadas por uma gama de patógenos, inclusive por aqueles diferentes do patógeno que iniciou o ataque (HEIL e BOSTOCK, 2002; SPOEL *et al.*, 2003; RÖSE e TUMLINSON, 2005).

A indução dessas respostas de defesa é regulada por uma complexa rede de sinalização iniciada após o reconhecimento da planta pelo patógeno (REN *et al.*, 2006). Molecularmente, sistemas de defesa dependem de uma combinação de uma série específica de genes dominantes R em plantas e uma série correspondente de genes denominados avirulentos (Avr) no patógeno (KEEN, 1990). Essa estratégia de resistência gene-a-gene fundamenta a base molecular do sistema de defesa vegetal. Ela foi originalmente proposta por Flor (1955) e, de acordo com ela, se uma planta possui gene de resistência (R) dominante correspondente ao gene de avirulência (Avr) dominante do patógeno, a interação é dita incompatível e a doença não se desenvolve; se a planta possui gene R não correspondente ao gene Avr, a interação é compatível e a infecção progride (HAMMERSCHMIDT, 1999). Numa certa interação planta-patógeno, freqüentemente mais de uma específica

combinação de genes R e Avr estão envolvidas e essas múltiplas combinações refletem a complexidade dos mecanismos de defesa.

2.3.1 - Indução de Respostas de Defesa

As defesas químicas podem ser induzidas por diversos tipos de elicitores, que podem ser biológicos, químicos e físicos (TERRY e JOYCE, 2004). Elicitores interagem com receptores da membrana da célula vegetal, gerando moléculas sinalizadoras que, subseqüentemente, ativam genes específicos para enzimas relacionadas com a biossíntese de metabólitos secundários (COSIO *et al.*, 1996; ZHAO *et al.*, 2005) e genes envolvidos na expressão de proteínas associadas com as respostas de defesa da planta contra o ataque de patógenos (SEMBDNER e PARTHIER, 1993; NÜRNBERGER *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2006), bem como com a resposta hipersensitiva (REPKA *et al.*, 2004).

Dentre as substâncias químicas naturais que são capazes de atuar como elicitores de respostas de defesa destacam-se: o ácido salicílico (AS) (ZAINURI *et al.*, 2001; YAO e TIAN, 2005), a quitosana (FAJARDO *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 2000) e os jasmonatos (DROBY *et al.*, 1999; YAO e TIAN, 2005; BRUINSMA *et al.*, 2007).

2.3.1.1 - Ácido Jasmônico como Elicitor de Respostas de Defesa Vegetal

O ácido jasmônico (JA) e seus derivados, incluindo metil jasmonato (MeJA), coletivamente chamados de jasmonatos, são ciclopentanonas (FIGURA 2) encontradas em centenas de espécies de plantas de diversas famílias, dentre elas samambaias e musgos, sugerindo estarem distribuídos em todo o reino Plantae (SEMBDNER e GROSS, 1986; SEMBDNER e PARTHIER, 1993). Os jasmonatos estão envolvidos em vários eventos fisiológicos da planta, como na germinação, formação do tubérculo, amadurecimento do fruto e em respostas de defesa contra o

ataque de patógenos e à injúria (KODA *et al.*, 1992; SEMBDNER e PARTHIER, 1993; BRUINSMA, 2007).

Uma das principais vias de transdução de sinal envolvida na defesa vegetal é a via do octadecanóico (ARIMURA *et al.*, 2005). Um composto central nessa via é o JA, que têm papel relevante na defesa direta e indireta de muitas espécies vegetais. O tratamento de tecidos de plantas com JA ou MeJA induz aumento transiente de níveis endógenos de jasmonatos (CREELMAN *et al.*, 1992; KUMARI, 2006) e, conseqüentemente, alterações na expressão gênica, levando à síntese de vários tipos de proteínas chamadas proteínas induzidas por jasmonato (JIPs) (SEMBDNER e PARTHIER, 1993; REINBOTHE *et al.*, 1994; MEWIS *et al.*, 2005; KUMARI, 2006). Dezenas de JIPs já foram identificadas em tecidos de plantas tratados com jasmonato, incluindo as proteínas inativadoras de ribossomos (REINBOTHE *et al.*, 1994; CHAUDHRY *et al.*, 1994), proteínas de armazenamento (ANDERSON *et al.*, 1989), lipoxigenases (TRANBARGER *et al.*, 1991; KATO *et al.*, 1993), fenilalanina amônia-liase e proteínas ricas em prolina (REINBOTHE *et al.*, 1994). Muitas JIPs estão diretamente associadas com as respostas de defesa da planta contra o ataque de patógenos e herbívoros e, também, à injúria (SEMBDNER e PARTHIER, 1993; BRUINSMA *et al.*, 2007). Ademais, PR-proteínas se acumulam rapidamente após o tratamento de tecidos vegetais com jasmonato (REPKA *et al.*, 2004; JWA *et al.*, 2006). Muitas dessas proteínas induzidas por JA são proteínas antifúngicas.

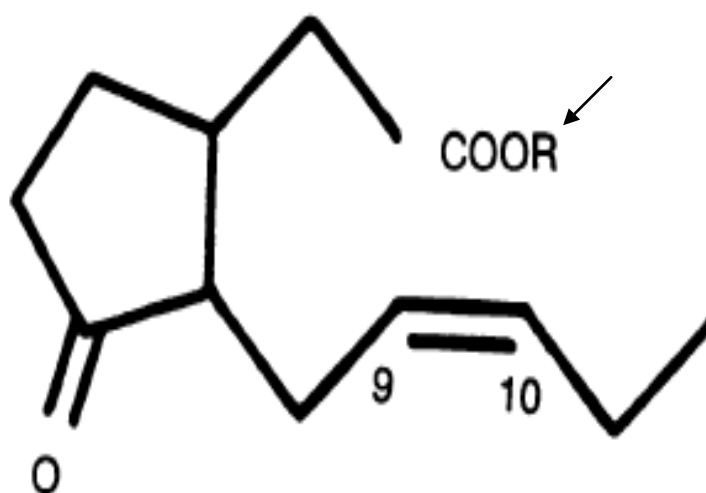


FIGURA 2 - Representação do ácido jasmônico, quando R é um hidrogênio, e do metil jasmonato, quando R é um grupamento metil.

Proteínas ricas em prolina, mais especificamente proteínas ricas em hidroxiprolinas, estão envolvidas no fortalecimento da parede celular vegetal (CASSAB e VARNER, 1988). Bradley *et al.* (1992) mostraram que uma proteína rica em prolina foi rapidamente induzida por ácido jasmônico, modificando a estrutura da parede celular para impedir o avanço do fungo para sítios não infectados. O tratamento de sementes de melão com JA induziu rápido aumento da atividade das PR-proteínas quitinase e peroxidase, aumentando a resistência dessas sementes a fungos (BUZI *et al.*, 2004).

O conjunto de informações aqui apresentadas mostra que o tratamento de tecidos vegetais com ácido jasmônico é uma alternativa bastante promissora para potencializar o sistema de defesa vegetal, principalmente induzindo uma maior expressão de proteínas antifúngicas.

2.4 - Proteínas Antifúngicas

Proteínas e peptídeos antifúngicos têm atraído a atenção de um grande número de pesquisadores, devido ao seu potencial em proteger grãos economicamente importantes contra o ataque de fungos (NG, 2004; XIA e NG, 2005; NGAI e NG, 2007). Ademais, muitas desses compostos também inibem o crescimento de fungos patogênicos ao homem (SELITRENNIKOFF, 2001, PELEGRINI *et al.*, 2006). Muitos tipos de novos peptídeos e proteínas exibindo essa atividade estão emergindo (MELO *et al.*, 2005; AGIZZIO *et al.*, 2006; PELEGRINI *et al.*, 2006; HO *et al.*, 2007). Alguns exemplos desses compostos incluem: proteínas semelhantes à taumatina (HO *et al.*, 2007); inibidores de proteases (WANG e NG, 2006b); quitinases (TAIRA *et al.*, 2005); glucanases (VOGELSANG e BARZ, 1993); proteínas tipo ciclofilinas (YE e NG, 2000); proteínas inativadoras de ribossomos (LEAB *et al.*, 1991; NG e PARKASH, 2002); lectinas (MELO *et al.*, 2005; XIA e NG, 2005; NGAI e NG, 2007); peptídeos antimicrobianos (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002; EGOROV *et al.*, 2005) e proteínas de reserva do tipo albuminas 2S (PELEGRINI *et al.*, 2006).

Os genes que codificam alguns desses peptídeos e proteínas antifúngicos têm sido utilizados para produzir plantas geneticamente modificadas, no intuito de

umentar a resistência contra doenças fúngicas (HOLTORF *et al.*, 1998; TARRINI *et al.*, 2004). Todavia, há muita discussão acerca da aceitação de plantas transgênicas e seus derivados, visto que muitos aspectos têm sido questionados e revistos (SELITRENNIKOFF, 2001). Dessa forma, uma alternativa viável e promissora é a identificação de peptídeos e proteínas com ação contra fungos e indução, através de elicitores, de sua expressão, principalmente em sementes, uma vez que estas constituem a principal fonte de reserva e de propagação das espécies, sendo, também, um dos órgãos mais afetados pelo ataque de fungos.

Em geral, as proteínas antifúngicas de origem vegetal atuam no sistema de defesa da planta, sendo constitutivas ou induzidas (BOMAN, 2000; VAN DEN BERGH *et al.*, 2002). De uma forma mais abrangente, dependo de seu modo de ação, essas proteínas podem ser agrupadas em: 1) as que atuam na parede celular do patógeno; 2) as que modificam as propriedades da sua membrana celular; e 3) as que utilizam a maquinaria intracelular fúngica para impedir o desenvolvimento desses organismos.

2.4.1 - Proteínas Vegetais Antifúngicas que Atuam na Parede Celular

A parede celular dos fungos protege o organismo contra condições hostis, além de alguns de seus componentes funcionarem como elicitores, gerando sinais de invasão e infecção para a planta (SELITRENNIKOFF, 2001). É importante ressaltar que os fungos possuem uma pressão de turgor significativa e que qualquer alteração na parede celular resulta em lise celular (HAROLD e CALDWELL, 1990; KAMINSKYJ *et al.*, 1992).

Boleti *et al.* (2007) isolaram uma proteína presente em sementes *Pouteria torta* com propriedades semelhantes as lectinas. Pouterina é uma proteína ligante a quitina e foi capaz de inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum* (85%), *Colletotrichum musae* (54%) e *Saccharomyces cerevisiae* (100%). A concentração de pouterina para inibir o crescimento desses fungos foi de 280 µg/mL. Quitina, mananas e outros polissacarídeos são componentes importantes da parede celular da maioria dos fungos e pouterina pode inibir o crescimento desses fungos por interagir com esses carboidratos. A variação na inibição do crescimento desses

fungos por lectinas pode ser devido a diferenças na composição molecular e organização da parede celular desses fungos (VAN PARIJZ, 1992).

Van den Bergh *et al.* (2004) demonstraram um efeito sinérgico entre uma quitinase e uma proteína ligante à quitina, ambas isoladas da planta *Euonymus europaeus*, que quando combinadas inibiram o crescimento dos fungos *Neurospora crassa*, *F. culmorum* e *Botrytis cinera* em concentração muito menor do que aquela observada para as proteínas individualmente. A combinação da concentração mínima inibitória para os três fungos consistiu de 1 e 3 µg/mL da proteína ligante à quitina e da quitinase, respectivamente. A quitinase promoveu a degradação catalítica das cadeias nascentes de microfibrilas de quitina presentes na parede celular dos fungos. Como resultado direto da ação da quitinase, os resíduos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) gerados foram alvos para a proteína ligante à quitina, que possui uma alta afinidade tanto para a quitina como para trímeros e tetrâmeros de GlcNAc. Essa ligação impediu a formação de ligações cruzadas envolvendo a quitina e a cadeia nascente de quitina e de quitina e microfibrilas de β-glucanos.

Uma proteína de 30 kDa isolada de sementes de *Sorghum bicolor* mostrou potente atividade contra *Candida albicans*. O efeito deletério da proteína na parede celular da levedura foi a principal razão de inibição da formação do tubo de germinação, já que a integridade da parede celular é necessária para a divisão celular (MINCOFF *et al.*, 2006).

2.4.2 - Proteínas Antifúngicas que Atuam na Membrana Celular

Além da parede celular, outro alvo de peptídeos e proteínas antifúngicos é a membrana celular, que regula a entrada e saída de compostos e participa de eventos envolvidos com a transdução de sinal do meio externo para o interior da hifa (DEACON, 1997).

Defensinas de plantas, como aquelas isoladas de *Raphanus sativus* (RS-AFP₂) e de *Dahlia merckii* (*Dm*-AMP₁), foram capazes de inibir o crescimento dos fungos *F. culmorum* e *N. crassa*, por induzirem a permeabilização de suas membranas, com conseqüente influxo de íons. Essa permeabilização parece estar

relacionada à formação de interações diretas entre os peptídeos e fosfolípidos (THEVISSSEN *et al.*, 1999).

Proteínas de reserva do tipo albuminas 2S constituem uma mistura de proteínas de baixa massa molecular que, também, são passíveis de apresentar atividade antifúngica, através de mecanismos envolvendo alterações da permeabilidade da membrana celular e/ou da morfologia da parede celular. Recentemente, um peptídeo isolado de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*), apresentando similaridade com albuminas 2S, foi capaz de inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, por alterar a permeabilidade de sua membrana (AGIZZIO *et al.*, 2006).

Lectinas constituem, também, um outro exemplo de proteína antifúngica, cujo mecanismo de ação pode estar relacionado a alterações na membrana celular. Uma lectina isolada de sementes de *Luetzelburgia auriculata* foi capaz de interferir no transporte de prótons na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, inibindo 60% da atividade da bomba de próton H⁺-ATPase (MELO *et al.*, 2005). Bombas de prótons presentes na membrana celular são responsáveis pela regulação e manutenção do gradiente de prótons necessário para a entrada de nutrientes (SERRANO, 1989; MONK e PERLIN, 1994).

2.4.3 - Proteínas Antifúngicas que Atuam em Alvos Intracelulares

Adicionalmente às classes de proteínas já mencionadas, que atuam na superfície celular dos fungos, outras classes de proteínas antifúngicas inibem o crescimento desses organismos por impedirem a síntese ou a atividade de componentes vitais, tais como proteínas, enzimas e RNAs.

Uma PR-proteína (PR-10) de 20 kDa identificada a partir de uma biblioteca de cDNA de um clone de *Arachis hypogaea*, exerceu atividade ribonucleásica, sendo responsável pela inibição do crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *R. solani* (CHADHA e DAS, 2006).

Hispina, uma proteína inativadora de ribossomos do tipo I, foi isolada e caracterizada a partir de sementes de *Benincasa hispida*. Interessantemente, a hispina mostrou atividade antifúngica espécie-específica, uma vez que os fungos

Coprinus comatus, *F. oxysporum*, *Physalospora pisicola* e *Mycosphaella arachidicola* foram sensíveis à proteína, ao passo que *B. cinerea* mostrou-se resistente (NG e PARKASH, 2002). Proteínas inativadoras de ribossomos possuem atividade antifúngica intrínseca devido à sua habilidade de inativar ribossomos de fungos tanto *in vitro* como *in situ* (SELITRENNIKOFF, 2001).

2.5 - Toxinas da Soja

Embora mais de cem proteínas tenham sido identificadas em sementes de soja (HERMAN *et al.*, 2003), muitas delas ainda estão para ser identificadas e caracterizadas (MOONEY *et al.*, 2004; HADJUCH *et al.*, 2005).

Os estudos de toxicidade em soja começaram com Liener (1951), quando verificou que o extrato bruto aquoso de sementes era capaz de matar camundongos, quando injetado por via intraperitoneal (i.p.). Essa toxicidade foi inicialmente atribuída aos inibidores de tripsina (SBTI) e/ou aglutinina (SBA), proteínas constitutivas encontradas nas sementes. Entretanto, logo nos anos seguintes, foi verificado que a fração tóxica, denominada *soyina*, era destituída de capacidade de inibir tripsina e de aglutinar eritrócitos (LIENER e PALLANSCH, 1952; PALLANSCH e LIENER, 1953). Apesar da descoberta de toxicidade aguda em extratos de soja e, ainda, da observação de que o princípio tóxico era de natureza protéica, o isolamento e caracterização da(s) toxina(s) não se sucederam, fato este justificado pela instabilidade e baixo rendimento da(s) proteína(s) durante as etapas de purificação da toxina (SAMBETH *et al.*, 1967). Somente quase 40 anos depois, é que os estudos foram retomados, quando Carlini e colaboradores (1988) verificaram a coexistência de lectinas e toxinas em várias sementes de leguminosas, inclusive na soja. Em 1994, Vasconcelos e colaboradores isolaram e caracterizaram parcialmente uma proteína tóxica da soja, denominada de soyatoxina (SYTX), incapaz de inibir a tripsina e de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies. Neste mesmo trabalho, durante o processo de purificação da SYTX, foi verificada a existência de uma outra fração tóxica, servindo, alguns anos mais tarde, como fonte para o isolamento e caracterização parcial de uma outra toxina, denominada de

toxina da soja (SBTX), com características físico-químicas distintas da SYTX, lectina e inibidores de tripsina (SIEBRA, 2004).

A SBTX é uma proteína de 44 kDa, composta por duas subunidades distintas, unidas por pontes dissulfeto. Esta toxina apresenta uma DL_{50} de 6,0 e 5,6 mg/Kg de peso corpóreo, quando administrada em camundongos pelas vias i.p. e intravenosa (i.v.), respectivamente, sendo capaz de ocasionar uma série de sintomas clínicos caracterizados por dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas, precedendo a morte do animal. Em decorrência da sintomatologia verificada em camundongos, esta toxina foi classificada como neurotoxina. Além dos efeitos verificados em mamíferos, a SBTX foi capaz de inibir o crescimento do fungo *Cercospora sojina* e de exercer efeitos tóxicos aos insetos *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus*. Estudos adicionais mostraram que essa toxina não está apenas localizada nas sementes, tendo sido detectada também no caule, folha e raiz (SIEBRA, 2004).

Como os resultados de atividades biológicas da SBTX sugerem sua participação nos mecanismos de defesa da soja, o presente trabalho foi conduzido com a premissa de fornecer novos dados estruturais e biológicos sobre esta molécula que contribuíssem para um melhor entendimento do papel fisiológico desta toxina.

3. OBJETIVOS

3.1 - Geral

Avaliar a função da toxina da soja (SBTX) como uma proteína de defesa vegetal, dando ênfase aos seus aspectos estruturais, sua ação frente a diferentes espécies de fungos fitopatogênicos e expressão diante do tratamento das sementes com ácido jasmônico, com vistas ao desenvolvimento de aplicações biotecnológicas desse conhecimento.

3.2 - Específicos

- Obter a seqüência NH₂-terminal da SBTX;
- Obter dados referentes à estrutura secundária da SBTX;
- Avaliar a ação da SBTX sobre a germinação de esporos e crescimento das hifas de diferentes fungos fitopatogênicos de importância agrícola;
- Obter dados que colaborem para elucidação do mecanismo de ação da SBTX frente aos fungos fitopatogênicos;
- Avaliar a expressão da SBTX diante do tratamento das sementes com doses crescentes de ácido jasmônico.

4. MATERIAIS



4.1 - Sementes

Sementes quiescentes de soja (*Glycine max* L. Merrill), genótipos IAC-17 e IAC-24, foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, São Paulo.

4.2 - Animais de Experimentação

4.2.1 - Camundongos

Camundongos Swiss (*Mus musculus*), com 20 a 25 g de massa corpórea, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

4.2.2 - Coelho

Coelho albino da raça Nova Zelândia, com três meses de idade, foi utilizado para imunização e posterior obtenção de anticorpos policlonais anti-SBTX, genótipo IAC-24. O animal foi adquirido no setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia e mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos da UFC.

4.3 - Fungos

4.3.1 - Fungos Filamentosos

Os fungos fitopatogênicos, *Aspergillus niger*, *Penicilium herquei*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani* foram obtidos da micoteca mantida pelos Laboratórios de Proteínas Vegetais de Defesa, ambos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

4.3.2 - Fungos Levuriformes

As espécies de leveduras *Candida albicans* (CE022), *Kluyveromyces marxianus* (CE025) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foram obtidas da micoteca mantida no Laboratório de Microbiologia da UFC. As cepas foram mantidas em cultura e conservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Os números entre parênteses ao lado de cada espécie correspondem ao código de acesso na micoteca do Departamento de Microbiologia da UFC.

4.4 - Reagentes Químicos

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina, anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, “Coomassie Brilliant Blue” G e R, dithiotreitol, *N,N,N',N'*-tetrametiletanolamina, membranas de difluoreto polivinilideno (PVDF) e marcadores de massa molecular foram obtidos da Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.

B-mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

As matrizes cromatográficas foram adquiridas da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Os reagentes utilizados para análise da seqüência NH₂-terminal foram adquiridos da Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japão.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

5. MÉTODOS



5.1 - Preparação da Farinha de Sementes

5.1.1 - Obtenção da Farinha

Para a obtenção da farinha, sementes quiescentes dos dois genótipos de soja (IAC-17e IAC-24) foram, primeiramente, trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho elétrico para café. As farinhas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e conservadas a 4 °C.

5.1.2 - Delipidação da Farinha

Farinhas dos diferentes genótipos foram delipidadas usando-se éter de petróleo, na proporção de 1:10 (m/v), sob exaustão em capela, à temperatura ambiente (20 °C), até a completa remoção dos lipídios. As farinhas delipidadas foram deixadas sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, até a evaporação total do solvente. Uma vez delipidadas, as farinhas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e conservadas a 4 °C.

5.2 - Determinação de Proteína

Para determinação do teor de proteínas, foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 µL de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso foram feitas leituras de absorbâncias a 595 nm (espectrofotômetro tipo Novapesc II, Pharmacia). A concentração protéica foi estimada através de uma curva obtida a partir de concentrações conhecidas de BSA (padrão).

5.3 - Detecção e Quantificação da Toxina

Para avaliação de toxicidade da SBTX, através das vias i.p. e i.v., foram usados camundongos Swiss, pesando entre 20-25 g, alimentados *ad libitum* com dieta peletizada comercial. Diferentes teores de proteína foram testados de modo a encontrar a dose máxima não letal, a dose mínima capaz de causar 100% de letalidade e doses intermediárias envolvendo percentuais no intervalo de 0-100%. Para avaliação da toxicidade por via i.p., foram considerados válidos apenas os resultados observados no período de 24 h, enquanto que aquela avaliada por via i.v. até 1 h de administração. A toxicidade foi expressa como DL₅₀, sendo uma unidade considerada como a quantidade de proteína (mg de proteína/Kg de peso corpóreo) necessária para produzir convulsões e morte em 50% dos animais testados (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

5.4 - Purificação da Toxina da Soja (SBTX)

5.4.1 - Extração e Fracionamento com Sulfato de Amônio

Os protocolos utilizados para extração e purificação da SBTX foram de acordo com Siebra (2004). Para obtenção do extrato total, a farinha delipidada dos diferentes genótipos foi posta em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, na proporção 1:5 (m/v), contendo ditioneitol (DTT) 5 mM, deixada sob agitação contínua por 3 h, 4 °C, sendo, em seguida, filtrada em pano de trama fina. O resíduo obtido foi re-extraído nas mesmas condições descritas. Os filtrados foram reunidos e centrifugados a 15.000 x g, 30 minutos, 4 °C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido denominado de Extrato Total. Este foi filtrado em papel de filtro, dialisado (*cut-off* MW 12.000) contra tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e, então, adicionado DTT 5 mM, sendo denominado de PREP. A (FIGURA 3).

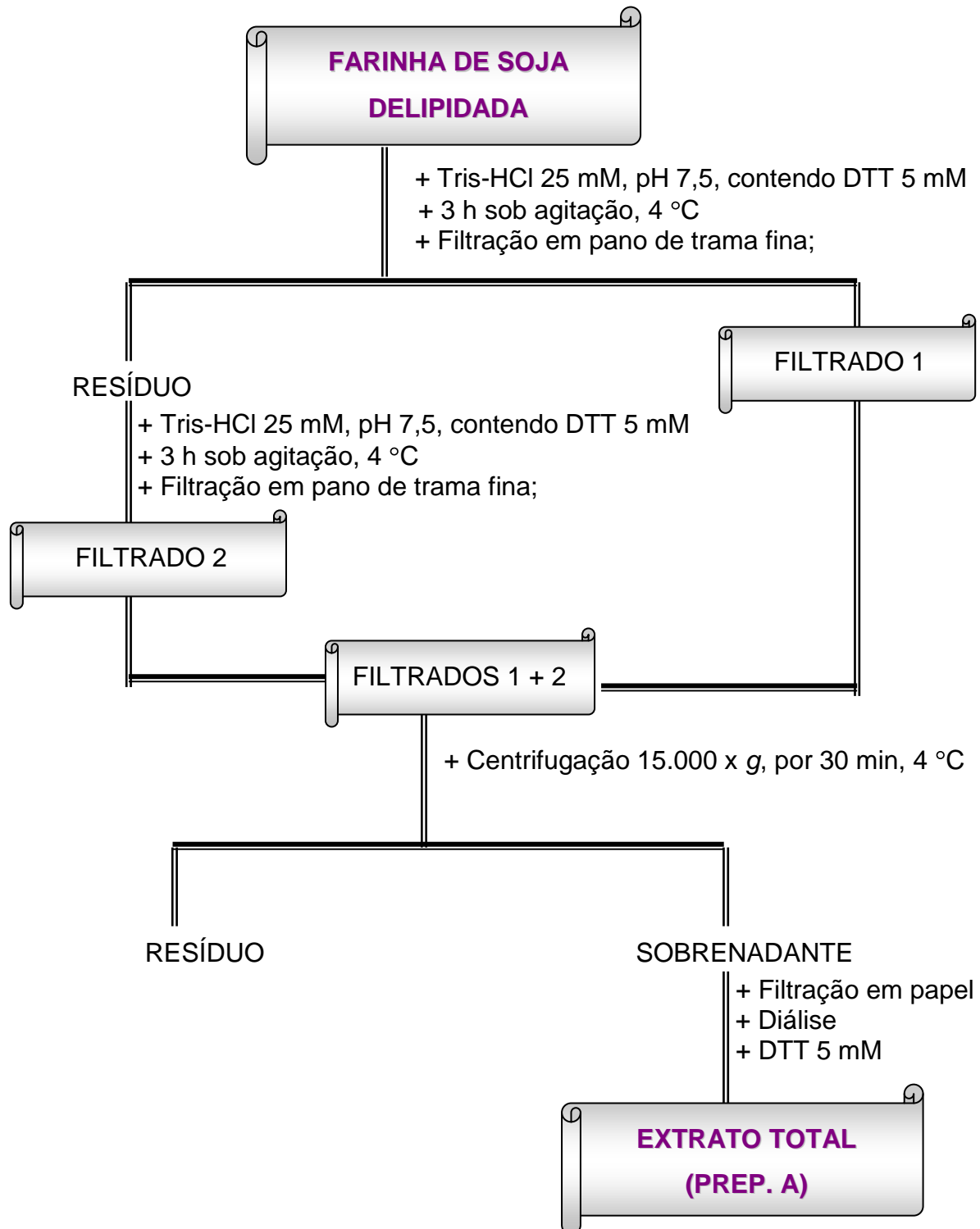


FIGURA 3 - Esquema de obtenção do extrato total.

A partir da obtenção do PREP. A, foram feitas precipitações protéicas nas faixas de 0-20% e 20-55% de saturação com sulfato de amônio sólido. Essas frações foram dialisadas exaustivamente contra Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM. A fração 20-55%, encerrando praticamente toda a atividade tóxica, foi denominada de PREP. B e utilizada nas etapas subseqüentes de purificação da toxina (FIGURA 4).

5.4.2 - Cromatografias

Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

Alíquotas do PREP. B (400 mgP) foram aplicadas em coluna de DEAE-Celulose (38,0 x 1,6 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM. Em seguida, a coluna foi percolada com o mesmo tampão de equilíbrio até que as proteínas não retidas (PREP. C-Ia e C-Ib) fossem completamente removidas. A eluição das proteínas retidas foi efetuada com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M (PREP. C-II). O fluxo utilizado foi de 40 mL/h e frações de 2,2 mL foram coletadas, a 4 °C (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). A cromatografia foi monitorada através de leituras a 280 nm. Logo após, DTT foi adicionado a cada fração para uma concentração final de 5 mM. Ao final do processo, a toxicidade para camundongos foi avaliada pelas vias i.p e i.v.

Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose

O material tóxico não retido (PREP. C-Ia) foi concentrado com sulfato de amônio sólido a 100% de saturação e centrifugado a 15.000 x g, por 25 minutos, a 4 °C. O precipitado obtido foi ressuspendido em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM, e dialisado exaustivamente contra o referido tampão. Alíquotas do PREP. C-Ia (100 mgP) foram aplicadas em coluna de CM-Sepharose (38,0 x 1,6

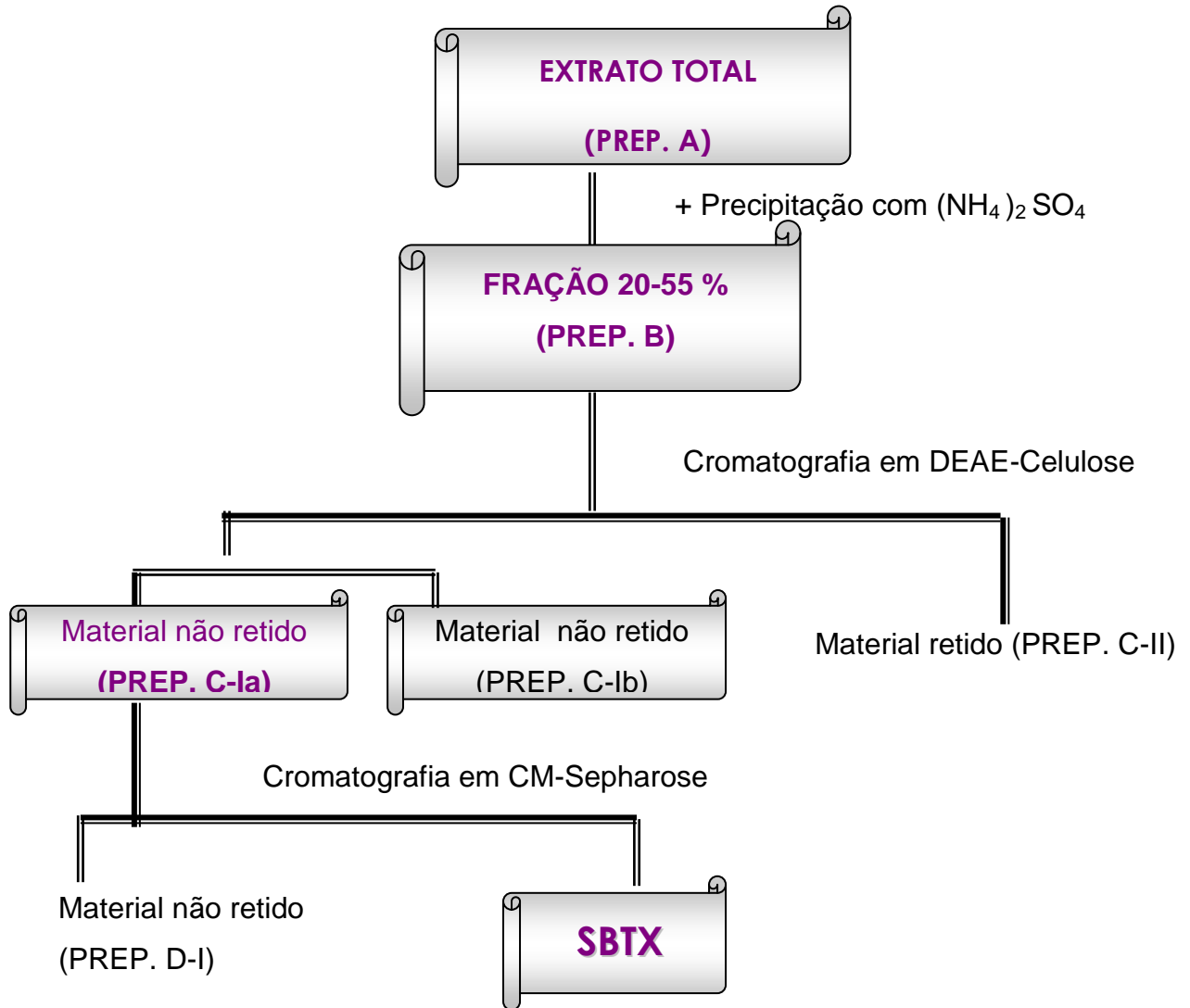


FIGURA 2 - Esquema geral de purificação da toxina da soja (SBTX).

cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM. Em seguida, a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio até que as proteínas não retidas (PREP. D-I) fossem completamente removidas. Conforme descrito por Siebra (2004), frações retidas, encerrando toda a atividade tóxica, foram eluídas com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,2 M (PREP. D-IIa). O fluxo utilizado foi de 40 mL/h e frações de 2,2 mL foram coletadas, a 4 °C (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). As frações correspondentes ao PREP. DII-a foram reunidas, concentradas com sulfato de amônio a 100% de saturação e dialisadas contra o tampão de extração para utilização no passo cromatográfico seguinte. A cromatografia foi monitorada através de leituras a 280 nm. Logo após, DTT foi adicionado para uma concentração final de 5 mM. Ao final do processo, a toxicidade para camundongos foi avaliada pelas vias i.p. e i.v.

Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Superdex 200 HR 10/30

Alíquotas do PREP. DII-a (2 mg/mL), filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore), foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 contendo NaCl 0,5 M. O processo cromatográfico foi desenvolvido em sistema FPLC (coletor Pharmacia LKB FRAC-100), a um fluxo constante de 0,5 mL/h, sendo coletadas alíquotas de 2,0 mL/tubo. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm e 220 nm e, em seguida, DTT foi adicionado às frações a fim de resultar uma concentração final de 5 mM para, então, serem utilizadas nos ensaios de toxicidade.

5.5 - Caracterização Físico-Química e Estrutural da SBTX

5.5.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

O perfil eletroforético da SBTX foi analisado segundo a técnica de Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o de separação 17,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. Amostras de SBTX (2 mg/mL) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0%, na ausência e presença de β -mercaptoetanol 5,0%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 15 minutos, e centrifugadas a 10.000 x g, 5 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol a fim de conferir densidade e cor às amostras, respectivamente. Alíquotas encerrando 20 μ L das amostras de SBTX foram aplicadas no gel, o qual foi submetido a uma corrente de 20 mA, durante 1 h. As bandas protéicas foram visualizadas por revelação com Prata (BLUM *et al.*, 1987). A metodologia utilizada consistiu de várias etapas e soluções: solução de fixação (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,5 mL/L), solução de lavagem (etanol 50%), solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,2 g/L), solução de impregnação (nitrato de prata 2 g/L e formaldeído 0,75 mL/L), solução de revelação (carbonato de sódio 60 g/L, formaldeído 0,5 mL/L e tiosulfato de sódio 0,2 g/L), solução de bloqueio da reação (metanol 50% e ácido acético 12%) e solução de enxague e acondicionamento (metanol 50%). Como marcadores de massa molecular foram usados: albumina sérica bovina (67,0 kDa), albumina do ovo (45,0 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24,0 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa). Comparação das mobilidades das bandas protéicas da toxina em relação àquelas dos marcadores foi empregada para o cálculo da massa molecular aparente da proteína em análise.

5.5.2 - Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH₂-Terminal

A seqüência de aminoácidos NH₂-Terminal da SBTX foi determinada através da degradação de Edman, utilizando-se um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu, modelo PPSQ-21/23). Para tanto, amostras da toxina (2 mg/mL) na ausência e presença de β-mercaptoetanol 5% foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (conforme descrita anteriormente) e, em seguida eletrotransferida (sistema “trans blot”, Multiphor II Pharmacia-LKB) para membrana de PVDF. A eletrotransferência foi conduzida a 50 V, 150 mA, por 45 minutos. Ao término, a membrana foi saturada com metanol 100% e, em seguida, lavada com água grau milli-Q e corada com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 0,1% em metanol 50% e ácido acético 1%, por 15 minutos. Decorrido esse tempo, a membrana foi descorada com uma solução de metanol 50% e ácido acético 1%, tendo sido trocada várias vezes até a visualização das bandas protéicas. As bandas correspondentes à proteína intacta (44 kDa) e as suas subunidades (27 kDa e 17 kDa) foram recortadas da membrana e submetidas à determinação de suas respectivas seqüências de aminoácidos NH₂-terminal. As seqüências obtidas foram submetidas ao alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

5.5.3 - Espectro de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram feitas no Laboratório de Biofísica e Espectroscopia do Instituto de Física de São Carlos – USP, usando cubetas de quartzo de 1 mL com 1 cm de caminho óptico (espectrofotômetro Perkin-Elmer). As amostras de SBTX (1 mg/mL) foram excitadas a 280 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300-440 nm.

5.5.4 - Estrutura Secundária Estimada por Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de CD foi determinado no Laboratório de Biofísica e Espectroscopia do Instituto de Física de São Carlos - USP, em um espectropolarímetro (Jasco, modelo J-720), no intervalo de 185 a 260 nm, sob N₂ constante, de acordo com as instruções do fabricante. As medidas foram feitas em amostras da SBTX dissolvidas em água deionizada (0,085 mg/mL), tendo sido usadas cubetas de quartzo de 0,2 mm de caminho óptico. A análise do espectro de CD, em termos do conteúdo de estrutura secundária (decomposição), foi feita usando o método Selcon-2, desenvolvido por Sreerama e Woody (1993).

5.6 - Avaliação da Atividade Antifúngica da SBTX

5.6.1 - Cultivo dos Fungos Filamentosos

Para avaliação do espectro de atividade antifúngica da SBTX, foram utilizados os fungos *Penicillium herguei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. O cultivo desses fungos foi realizado em 25 mL de meio ágar batata-dextrose (PDA), distribuídos em placas de Petri, com 10 cm de diâmetro, e mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D. a 25 °C, umidade de 70% e fotoperíodo de 12 h. O meio de cultura foi constituído de 39 g de ágar batata-dextrose, dissolvidas em 1 litro de água, preparado sob banho-maria com água em ebulição e autoclavado por 15 minutos, a 120 °C, 1,5 KGF. Os “pellets” repicados do meio de cultura foram colocados no centro das placas de Petri, que foram fechadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar.

5.6.2 - Obtenção dos Esporos

Após os fungos terem tomado todo o diâmetro da placa de Petri, cerca de 15 dias após o repique (cultura fresca), essas foram abertas em capela de fluxo laminar e adicionadas de 10 mL de água estéril. Com a utilização de uma alça de Drigalski, manuseada suavemente sobre a superfície do micélio, foi produzida a suspensão de esporos. Esta foi imediatamente filtrada em malha de nylon, para a remoção de resquícios de hifas, e denominada de solução padrão de esporos. Da solução padrão, foi promovido o ajuste da concentração para $2,0 \times 10^5$ esporos/mL, usados nos ensaios (GIFONI, 2005)

5.6.3 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Esporos

O efeito da SBTX sobre a germinação dos esporos foi avaliado de acordo com o método descrito por Ji e Kúc (1996), adaptado para o uso de placas de geminação (GIFONI, 2005). Uma alíquota de 10 μ L da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL) foi incubada com 10 μ L de uma solução de SBTX a diferentes concentrações (50, 100, 250 e 500 μ gP/mL). Como controles foram utilizados água estéril, peróxido de hidrogênio 100 mM, Tris HCl 25 mM e a solução de SBTX após tratamento térmico a 100 °C, por 30 minutos. As placas de germinação foram mantidas a 37 °C, por 12 h, na ausência de luz, conservando a umidade do local por meio de um papel de filtro embebido de água. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico (“Olimpus System Microscope BX 60”). Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

5.6.4 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade da Membrana de Esporos

O corante iodeto de propídeo (Calbiochem) foi usado para avaliar a integridade das membranas dos fungos *Penicillium herguei* e *Aspergillus niger*. Iodeto de propídeo é um corante com alta afinidade para ácido nucléico (DNA) que, facilmente, penetra em células com a membrana plasmática comprometida, o que não ocorre em membrana intacta. O ensaio foi realizado como descrito no item 5.6.3. Todavia, 1 μM de iodeto de propídeo foi adicionado à suspensão de esporos, seguida de incubação por 30 minutos a 37 °C. As suspensões foram transferidas para lâminas e visualizadas em microscópio fluorescente (“Olimpus System Microscope BX 60”). Foram considerados esporos permeabilizados aqueles em que os núcleos se apresentaram fluorescentes. Como controle, os 10 μL da solução de SBTX foram substituídos por 10 μL de uma solução de digitonina 5 mM, um detergente que ocasiona aumento de permeabilidade de membrana.

5.6.5 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Vesículas Fosfolipídicas

As vesículas fosfolipídicas foram preparadas a uma concentração de 20 mg/mL. A solução lipídica contendo os lipídios dioleilfosfatidilcolina (DOPC), esfingomiéline (SM), ácido fosfatídico (AP), nas proporções 47,5:47,5:5 (M/M/M), dissolvidos em CH_3Cl e metanol (2:1, v/v) foi evaporada sob fluxo de N_2 até secagem e colocada em um dessecador por 2 h. Em seguida, carboxifluoresceína 80 mM, uma sonda fluorescente solúvel em água, foi adicionada. O filme lipídico foi ressuscitado sob agitação em vortex. Os lipossomos multilamelares (LUVs) assim obtidos foram submetidos a 5-6 ciclos de congelamento-descongelamento em N_2 líquido e banho a 37 °C, respectivamente, alternadamente. Foram realizados 31 ciclos de extrusão, através de membranas de policarbonato de 100 nm de poro, a fim de obter LUVs contendo carboxifluoresceína. A população da sonda não

encapsulada foi separada dos LUVs por filtração em mini-coluna de Sephadex G-50 pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM e BSA 0,1 mg/mL de acordo com Lelkes (1984). A qualidade das vesículas preparadas foi comprovada mediante a sua ruptura com o detergente Triton X-100 0,1% (p/v). A fluorescência resultante foi três vezes superior à fluorescência basal das vesículas na ausência de qualquer agente permeabilizante.

Para monitorar a capacidade de SBTX em permeabilizar vesículas fosfolipídicas como modelo de membrana celular foram utilizados LUVs contendo carboxifluoresceína, segundo o método descrito por Hope *et al.* (1985) e MacDonald *et al.* (1991). A permeabilização foi acompanhada medindo a fluorescência da carboxifluoresceína liberada ao meio extravesicular. A fluorescência foi acompanhada através de excitação no comprimento de onda a 492 nm e detecção a 514 nm, à temperatura ambiente.

5.6.6 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido

Para avaliação da atividade antifúngica da SBTX em meio líquido, foi utilizada a metodologia descrita por Freire *et al.* (2002), com algumas modificações. Alíquotas de 10 µL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL) foram incubadas em 100 µL de meio “yeast potato dextrose” (YPD), por 12 h, a 37 °C, na ausência de luz. Decorrido o tempo de germinação, foram adicionados ao meio 100 µL da solução de SBTX a diferentes concentrações (50, 100, 250 e 500 µgP/mL), previamente filtrada (filtro Millex GV, porosidade de 0,22 µm). As absorbâncias a 630 nm foram lidas a intervalos de 12 h, até 96 h após o início do experimento. Como controles foram utilizados água estéril, peróxido de hidrogênio 100 mM e a toxina após tratamento térmico a 100 °C, por 30 minutos.

5.6.7 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras

Para obtenção das células de leveduras, alíquotas das espécies de *Candida albicans* (CE022), *Kluyveromyces marxianus* (CE025) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foram retiradas de uma placa de Petri, que possuía colônias crescidas, e colocadas em novas placas contendo Ágar Sabouroud, tendo sido feitas estriações sobre o meio para obtenção de um crescimento celular homogêneo. Esta nova placa foi deixada na estufa a 30 °C, por 48 h e, em seguida, usada para obtenção das células utilizadas no ensaio. Com o auxílio de uma alça, uma alíquota celular foi retirada e adicionada em 100 mL de NaCl 0,15 M, a fim de a quantificação dessas células ser efetuada, usando uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (“Olimpus System Microscope BX 60”).

A avaliação da atividade da SBTX sobre o crescimento celular de leveduras foi feita em meio líquido. Dessa forma, placas (96 poços) de cultura de células contendo 200 µL de meio de cultura para o crescimento celular (Ágar Sabouroud) receberam as células de leveduras (1×10^4 células/mL) e amostras de SBTX (50 e 100 µg/mL). O acompanhamento do efeito da SBTX sobre as leveduras testadas foi realizado através da densidade óptica calculada a partir de leituras a 620 nm em um leitor de ELISA a cada 6 h, por um período de 42 h. Controles foram feitos sem a adição da toxina no meio. Os ensaios foram feitos em triplicata e em condições de assepsia usando capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

5.6.8 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras

Este ensaio foi baseado na permeabilização de membranas de leveduras crescidas em presença de SBTX, avaliada através do corante *SYTOX green* (Invitrogen), segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.* (1999). *SYTOX green* é um corante fluorescente com alta afinidade para DNA, penetrando em células com a membrana plasmática comprometida. Assim, ao final do ensaio de

crescimento, conforme descrito anteriormente, uma alíquota contendo 2×10^6 células/mL foi incubada com *SYTOX green* a uma concentração final de $0,2 \mu\text{M}$, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após 30 minutos de incubação com o corante, o material a ser analisado foi colocado sobre lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina e analisado em microscópio óptico de fluorescência.

5.7 - Avaliação da Indução da SBTX por Ácido Jasmônico

5.7.1 - Esterilização das Sementes

Sementes de soja previamente selecionadas foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 2%, durante 5 minutos, e enxaguadas com água destilada estéril em 5 ciclos de 2 minutos cada.

5.7.2 - Tratamento das Sementes com Ácido Jasmônico

O tratamento das sementes consistiu da embebição de 10 sementes em 100 mL das seguintes soluções: água grau milli-Q estéril, etanol 0,05% e ácido jasmônico 30 e $50 \mu\text{M}$ em etanol 0,05%. As soluções foram preparadas em água grau milli-Q estéril e as sementes ficaram embebidas sob aeração artificial por 12 e 24 h. Decorridos os tempos de embebição, as sementes foram coletadas, congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para análises posteriores.

5.7.3 - Preparação do Extrato Bruto

As sementes devidamente secadas foram pesadas e submetidas à maceração com nitrogênio líquido até a obtenção de uma farinha fina. Às farinhas das sementes, foi adicionado tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, na proporção de 1:5 (m/v), sendo as suspensões submetidas à agitação constante, por 4 h, a 4 °C. Ao final, as suspensões foram centrifugadas a 15.000 x *g*, por 30 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes, denominados de extratos brutos, tiveram suas proteínas solúveis quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976).

5.7.4 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Para verificar a indução de SBTX por ácido jasmônico, o perfil eletroforético das farinhas de sementes de soja submetidas aos diferentes tratamentos foi avaliado segundo a técnica de Laemmli (1970), adaptada para placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrou 3,5% de acrilamida e 1,0 % de SDS preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o de separação 15% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. Amostras dos diferentes extratos vegetais, encerrando cerca de 0,5 mgP/ml, foram dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, na presença de β -mercaptoetanol 1,0%. O restante do procedimento foi similar àquele descrito no item 5.5.1. A intensidade das bandas protéicas referentes à SBTX foi determinada através do software Imagemaster 2D Platinum, versão 6.0 (Amersham Biosciences, Suécia).

5.7.5 - Ensaio Imunológicos

Obtenção de Anticorpos Policlonais Anti-SBTX

Para a produção e obtenção da fração imune IgG anti-SBTX foi seguida a metodologia originalmente descrita por Harboe e Ingild (1973). O soro imune contra

a SBTX foi obtido a partir de coelhos da raça Nova Zelândia branca. Os animais foram, inicialmente, inoculados via intramuscular (i.m.) com uma emulsão contendo 0,5 mg de SBTX, 0,5 mL de NaCl 0,15 M e 0,5 mL de adjuvante completo de Freund. Esse processo foi repetido após 21 dias, mas através da injeção subcutânea (s.c.), no dorso, e sem a adição de adjuvante de Freund. Após 7 dias do reforço, foi feita a 1ª sangria, através de pequena incisão longitudinal na veia marginal da orelha e aplicada uma outra dose de reforço preparada de forma idêntica à anterior. Esse procedimento foi realizado semanalmente até a obtenção de quantidade suficiente de soro imune. A colheita do sangue foi efetuada em tubos de ensaio, seguida de incubação a 37 °C, durante 1 h, após a qual o material foi mantido em geladeira (4 °C) por cerca de 12 h, para melhor retração do coágulo. Quando necessário, o soro foi centrifugado a 3.000 x g, 10 minutos, para separação de pequenos fragmentos de coágulo que, eventualmente, permaneciam em suspensão.

As imunoglobulinas foram obtidas por precipitação do soro imune com sulfato de amônio sólido a 33% de saturação. Procedeu-se, então, a três diálises alternadas com água e tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, durante seis dias. A última diálise foi feita com água, a qual foi seguida por centrifugação a 15.000 x g, 20 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi submetido à cromatografia em coluna de Proteína A-agarose P-2545, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Após a coluna ter sido equilibrada com o referido tampão, 20 vezes o seu volume, a amostra previamente centrifugada foi aplicada na coluna. O material retido, rico em IgG policlonal anti-SBTX, foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 3,0, contendo ácido cítrico 0,1 M. Esse material foi dialisado contra água grau milli-Q, concentrado por liofilização e armazenado a 2 °C.

Dot Blot

Os títulos dos anticorpos foram estimados como se segue: 10 µL de SBTX (1 mg/mL em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5) foram aplicados sobre membrana de nitrocelulose e deixados secar. Em seguida, a membrana foi bloqueada com tampão Tris 0,05 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05% e leite em pó

desnatado 5% (m/v), cujo tempo de contato foi 1 h. Decorrido esse tempo, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana incubada com o anticorpo anti-SBTX (1:100 e 1:200), por 2 h, a 37 °C. Após incubação, a membrana foi colocada no tampão de lavagem por cinco vezes consecutivas, cada uma com duração de 10 minutos e, então, incubada com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:1.000), por 1 h, a 37 °C. Após lavagem da membrana sob as mesmas condições, foi seguido o procedimento de revelação que consistiu em colocar a membrana em contato com o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT). A membrana de nitrocelulose foi deixada em contato com a solução do substrato e monitorada até que fosse visualizada mudança de coloração que caracterizasse a reação antígeno-anticorpo quando, então, foi lavada com sucessivas trocas de água e o título estimado. Prova em branco foi feita substituindo-se o anticorpo primário pelo soro pré-imune.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Para a determinação quantitativa de SBTX nos extratos de sementes de soja submetidos ao tratamento com ácido jasmônico, foi empregada a técnica de ELISA descrita por Rowhani e Falk (1995). Inicialmente, os extratos vegetais (antígenos) foram diluídos em tampão de acoplamento (carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) para uma concentração final de 25 µgP/mL. Preparadas as diluições, 50 µL dos diferentes antígenos foram aplicados em poços da placa de microtitulação para impregnação, por um período de 16 h, 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada com tampão PBST (fosfato de sódio 100 mM, fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e Tween 20 0,05%), por 60 minutos, e, posteriormente, com tampão PBST contendo leite em pó desnatado a 5%, por mais 60 minutos. Feito isso, a placa foi lavada com PBST por mais 60 minutos e, então, incubada com 50 µL de IgG anti-SBTX (diluído 1:100 em PBST), por 1 h, a 37 °C. A placa foi novamente lavada com tampão PBST (4 vezes, 10 minutos, cada) e incubada por 1 h, a 37 °C, com 50 µL de IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:1000 em PBST). Após lavagem da placa com tampão

PBST (4 vezes, 10 minutos, cada), 50 μ L da solução de revelação, contendo o substrato *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) presente na forma de tablete e dissolvido em água grau milli-Q, seguindo as especificações do fabricante (Sigma), foram aplicados aos poços. A reação foi parada com 50 μ L de NaOH 3 N, após intervalo de 16 h, e as leituras realizadas em leitor de ELISA (BIO-TEK ELX 800), a uma absorvância de 450 nm. O controle negativo consistiu da substituição do anticorpo IgG anti-SBTX pelo soro pré-imune (1:100 em PBST). Os teores de SBTX presentes nos diferentes tecidos foram estimados a partir de uma curva padrão obtida com amostras encerrando concentrações crescentes de SBTX (10 a 100 μ g/mL).

Tissue Print

A localização da SBTX em cotilédones submetidos ao tratamento com ácido jasmônico foi feita pela técnica de *tissue print* descrita por Terras *et al.* (1995). Nessa técnica, a eletrotransferência de proteínas é feita diretamente a partir de cortes ultrafinos do tecido para a membrana de PVDF, seguindo o método de Towbin *et al.* (1979).

Após as sementes terem sido embebidas nas soluções descritas no item 6.1.2 por 24 h, cortes longitudinais foram feitos a mão livre. Em seguida, o sanduíche foi montado sobre a célula de transferência na seguinte ordem: seis folhas de papel de filtro umedecidas com o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e 0,01% de SDS); a membrana de PVDF (previamente equilibrada em metanol 100%, por 15 segundos, seguida de incubação em água grau milli-Q, por 2 minutos, e tampão de transferência, por 5 minutos; os cortes do tecido e, finalizando o sanduíche, mais seis folhas de papel de filtro. A célula de transferência (sistema *Trans-blot* semi-seco) foi fechada e a eletrotransferência conduzida a uma corrente constante de 0,8 V/cm² de membrana, durante 1,5 h. Após a transferência, o sanduíche foi desfeito. A membrana foi bloqueada com fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,6, contendo leite em pó desnatado 5% (PBST), por um período de 2 h, à 37 °C. Em seguida, a membrana foi submetida a seis lavagens com PBST a intervalos de 10 minutos sob

agitação. Após a lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo primário, anti-SBTX (1:100) preparado em tampão bloqueador, por 2 h, à 37 °C. Após nova lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, 1:5000), durante 2 h, à 37 °C. Após lavagem com PBST, foi procedida a revelação, mergulhando-se a membrana em solução de substrato específico para a fosfatase alcalina (BCIP-NBT), preparado de acordo com as recomendações do fabricante (Sigma). Após o desenvolvimento da reação, a membrana foi lavada com água grau milli-Q, secada e guardada ao abrigo da luz.

5.8 - Análise Estatística

O efeito dos tratamentos foi analisado comparando-se as médias obtidas de quatro repetições. A diferença entre os tratamentos foi determinada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, onde a comparação entre as médias foi feita ao nível de 5%. Foi usado o programa GRAPH PAD INSTAT 3.06.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em três partes, de modo a possibilitar uma melhor compreensão e análise dos dados.

A parte 1 está relacionada aos aspectos estruturais da toxina da soja (SBTX). Nesta etapa, o principal foco foi investigar a seqüência de aminoácidos NH₂-terminal da SBTX intacta, bem como de suas subunidades, e avaliar a estrutura secundária dessa proteína, uma vez que os estudos anteriores tiveram como ênfase a sua caracterização físico-química. Sabe-se que a estrutura de uma proteína está intimamente relacionada à sua função. Assim sendo, espera-se que a abordagem estrutural aqui realizada, corrobore para o conhecimento do papel fisiológico dessa toxina.

A parte 2 compreende os ensaios biológicos, de modo a avaliar a participação da SBTX na defesa contra fungos fitopatogênicos. Nesta etapa, experimentos foram conduzidos utilizando-se diferentes espécies de fungos, tendo como foco a avaliação dos efeitos dessa toxina na germinação dos esporos e crescimento de hifas. Adicionalmente, experimentos foram conduzidos, buscando um entendimento do mecanismo de ação dessa proteína.

A parte 3 encerra os resultados oriundos da avaliação do comportamento da SBTX frente ao tratamento das sementes de soja com ácido jasmônico, um elicitador natural presente em várias espécies vegetais. Nesta etapa, foi avaliada a indução da SBTX, por eletroforese em gel de poliacrilamida e técnicas imunológicas, diante da embebição de sementes de soja em diferentes concentrações de ácido jasmônico, por tempos variados.

PARTE 1 – Purificação e Aspectos da Estrutura Primária e Secundária da Toxina da Soja (SBTX)

6.1 - Seleção do Genótipo

A existência de atividade tóxica nos extratos dos genótipos analisados, oriunda de componentes protéicos, foi comprovada nos testes de toxicidade. Dentre os dois genótipos analisados, o IAC-24 apresentou uma menor DL_{50} ($537,57 \pm 4,56$ mgP/Kg de peso corpóreo) do que o IAC-17 ($684,51 \pm 2,07$ mgP/Kg de massa corpóreo), tendo sido os valores encontrados significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os animais apresentaram vários sintomas clínicos, incluindo dispnéia, ataxia locomora, erupção dos pêlos que culminaram com convulsão e morte. Diante dos valores de DL_{50} encontrados, o genótipo IAC-24 foi selecionado para dar prosseguimento ao isolamento da SBTX e, de posse da SBTX purificada, foram realizados os estudos voltados à determinação de sua seqüência NH_2 -terminal e estrutura secundária.

6.2 - Extração e Purificação da SBTX

Para purificação da SBTX foi seguido o mesmo esquema utilizado por Siebra (2004). Brevemente, o PREP. B, obtido por precipitação do extrato total com sulfato de amônio sólido na faixa de 20-55%, foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose, resultando na obtenção de duas frações protéicas não retidas (PREP. Cla e Clb) e uma fração retida (PREP. CII), que foi eluída com o tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 1 M (FIGURA 5). O PREP.CIa, tóxico para camundongos pelas vias i.p e i.v., foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose (FIGURA 6). A aplicação do PREP. CIa resultou num material não retido à coluna (PREP. DI), obtido pela percolação da coluna com o tampão de equilíbrio, e de proteínas retidas eluídas com o mesmo tampão acrescido de

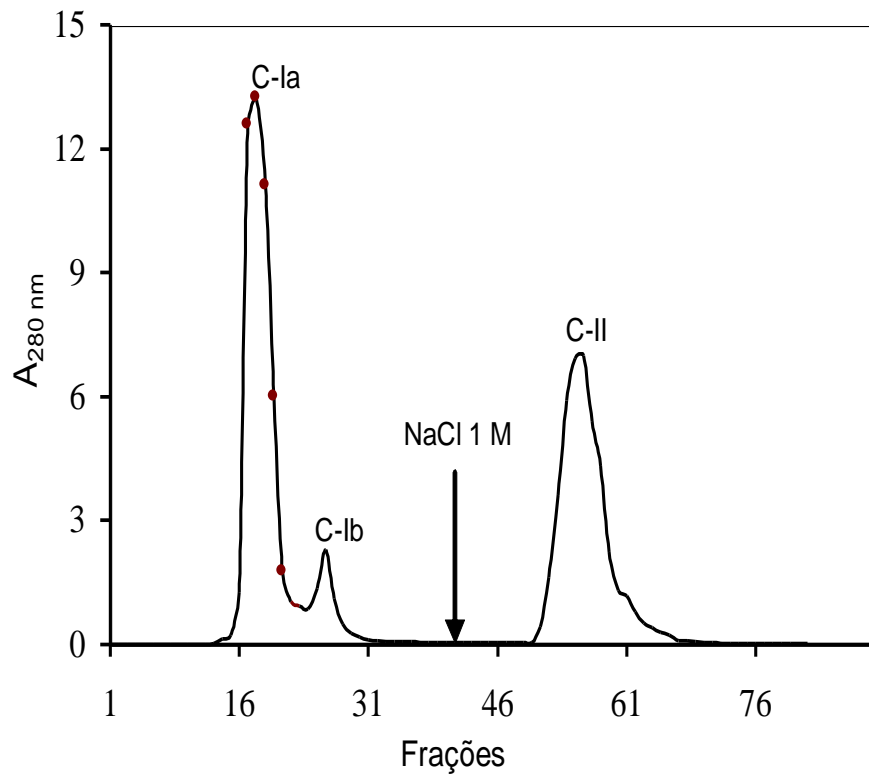


FIGURA 5 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose. Amostra do PREP. BII (400 mg), obtida por precipitação com sulfato de amônio (20-55%), foi aplicada em coluna de DEAE-Celulose (38,0 x 1,6 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. Fluxo: 40 mL/h; Frações: 2,2 mL.

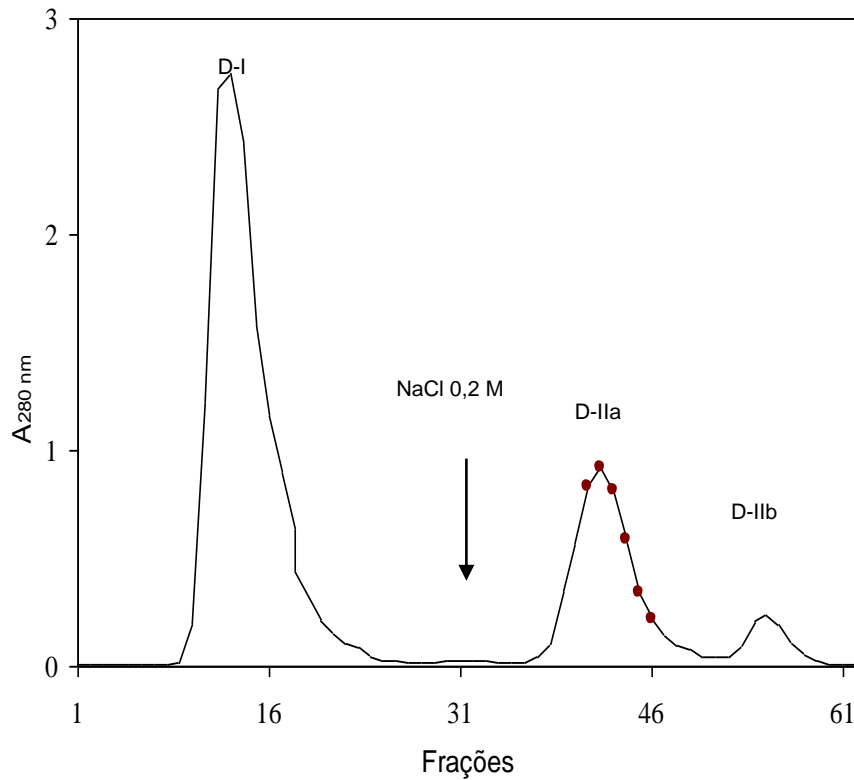


FIGURA 6 - Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose. Amostra do PREP. Cla (100 mg) foi aplicada numa coluna de CM-Sepharose (38,0 x 1,6 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 0,2 M (PREP. DIIa e PREP.DIIb). Fluxo: 40 mL/h; Frações: 2,2 mL.

NaCl 0,2 M. A aplicação de NaCl resultou em dois picos, sendo denominados de PREP. DIIa e PREP. DIIb. O PREP. DIIa concentrou toda a atividade tóxica quando injetado por i.p. ou i.v. em camundongos. O PREP. DIIa foi concentrado por liofilização e submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30 acoplada ao sistema FPLC (FIGURA 7). O processo cromatográfico resultou na obtenção de um único pico protéico de elevada pureza e toxicidade aguda para camundongos, quando injetado pelas vias i.p e i.v. Este procedimento foi repetido diversas vezes, tendo como finalidade o acúmulo de SBTX para utilização nas etapas posteriores. A estabilidade da SBTX foi obtida através da adição do agente redutor ditioneitol (DTT) a 5 mM e sua manutenção a 4 °C, sendo a sua atividade monitorada durante todo o processo de purificação através de testes de toxicidade para camundongos.

6.3 - Avaliação da Massa Molecular e Separação das Subunidades da SBTX

SBTX foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença e ausência de β -mercapetanol (FIGURA 8). Na ausência do agente redutor, SBTX apresentou uma banda principal de massa molecular aparente de 44,0 kDa (FIGURA 8, Raia 2). Todavia, na presença de β -mercaptoetanol 5%, a SBTX apresentou duas subunidades de massas moleculares aparentes de 27,0 e 17,0 kDa (FIGURA 8, Raia 3). Esse resultado está de acordo com o que foi descrito por Siebra (2004), mostrando ser a SBTX uma proteína dimérica, de massa molecular aparente de 44 kDa, composta por duas subunidades, unidas por pontes dissulfeto. Para separação das duas subunidades, foi necessária a adição de β -mercaptoetanol a 5%. Tentativas de separação das subunidades com concentrações mais baixas do agente redutor não renderam resultados satisfatórios.

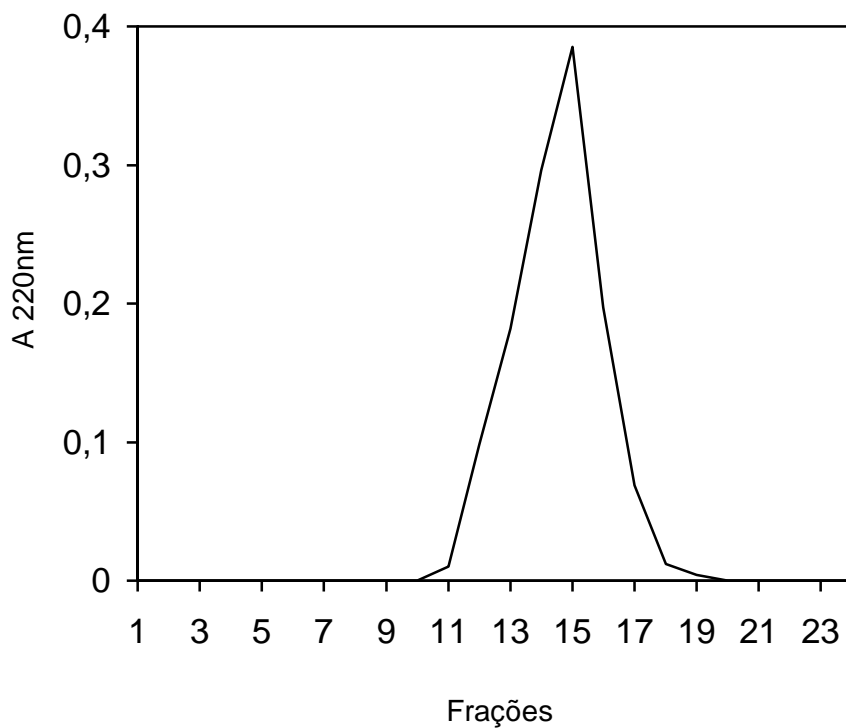


FIGURA 7 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30. Amostra do PREP. DIIa (2 mg) foi aplicada numa coluna de Superdex 200 HR 10/30 (30,0 x 1,0 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,5 M. Fluxo: 0,5 mL/h; Frações: 2,0 mL.

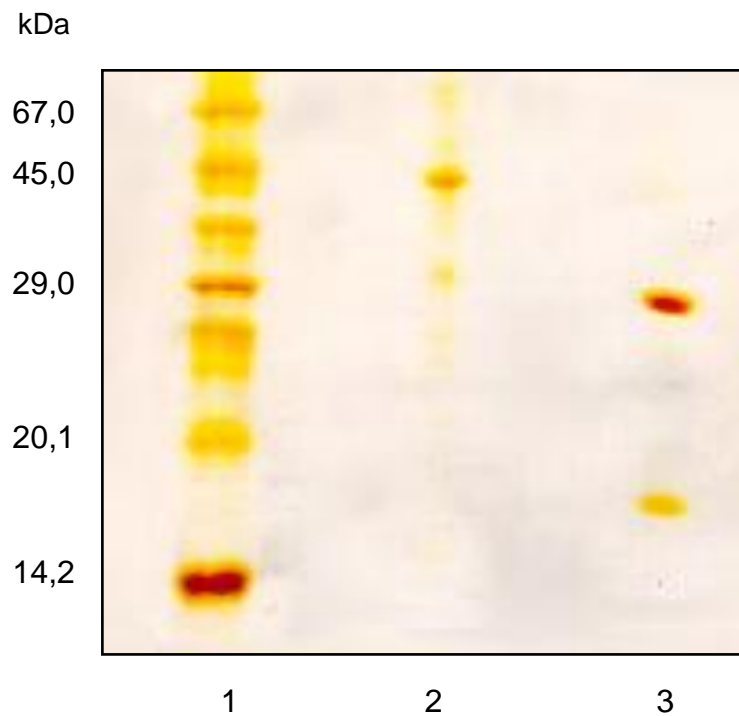


FIGURA 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da SBTX na presença e ausência de β -mercaptoetanol e SDS, revelada com prata. Raia 1 – Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina – 66,0 kDa; albumina do ovo – 45,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – 36,0 kDa; anidrase carbônica – 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 kDa e α -lactoalbumina – 14,2 kDa). Raia 2 – SBTX na ausência de β -mercaptoetanol, Raia 3 – SBTX na presença de β -mercaptoetanol 5%.

6.4 - Determinação da Seqüência NH₂-Terminal

A banda de 44 kDa verificada em PAGE-SDS, correspondente a toxina intacta, exibiu a seguinte seqüência de aminoácidos NH₂-terminal ADPTFGFTPLGLSEKANLQIMKAYD. Quando analisadas as subunidades, seqüência similar àquela encontrada para a banda de 44 kDa foi observada para a banda de 27 kDa. Já a subunidade de 17 kDa mostrou uma seqüência de aminoácidos distinta em sua extremidade NH₂-terminal, representada por PNPKVFFDMTIGGSAGRIVMEEYA. Os resultados nos permitem concluir que a SBTX é formada por duas subunidades distintas não apenas em relação às massas moleculares e aos pontos isoelétricos, como demonstrado anteriormente por Siebra 2004, mas, também, no que diz respeito às suas seqüências aminoacídicas.

A seqüência de aminoácidos NH₂-terminal tanto da proteína intacta, como de sua subunidade de 27 kDa apresentou 80% de identidade com aquela encontrada para a SC24, uma abundante proteína de 24 kDa purificada a partir de cascas de sementes de soja, com atividade ligante a grupamentos carboxilatos (DHAUBHADEL *et al.*, 2005). Apesar da alta identidade verificada entre a SBTX e essa proteína, a atividade tóxica foi testada no extrato protéico de sementes destegumentadas que, por sua vez, apresentou toxicidade para camundongos por via i.p., cuja DL₅₀ foi 722 ± 2,86 mgP/Kg de peso corpóreo. Todavia, diferentemente ao que foi observado com as bandas de 44 e 27 kDa, a subunidade de 17 kDa exibiu elevada identidade com várias ciclofilinas, particularmente com a de soja (96%) (TABELA 3).

TABELA 3 - Alinhamento da seqüência NH₂-terminal da SBTX com outras proteínas vegetais apresentando seqüências similares

Proteína	Espécie	Resíduo	Seqüência NH ₂ -terminal	% Identidade
SBTX 44 e 27 kDa	<i>Glycine max</i>	1	ADPTFGFTPLGLSEKANLQIMKAYD	100
SC24 ^a	<i>Glycine max</i>	27SSS.....Q.P..	80
SBTX 17 kDa	<i>Glycine max</i>	1	PNPKVFFDMTIGGQSAGRIVMEEYA	100
Ciclophilinas ^b	<i>Glycine max</i>	2L..	96
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2P.....F.L..	88
	<i>Digitalis lanata</i>	3PC.....L...	87
	<i>Cucumis sativis</i>	2TP.....L..	84
	<i>Vigna radiata</i>	2P..K..F.LF.	80
	<i>Vicia faba</i>	3V...N....IF.LF..	75

^a Seqüência deduzida de SC24, uma proteína da casca da soja (Dhaubhadel *et al.*, 2005).

^b Fonte: NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov).

6.5 - Estrutura Secundária Estimada por Dicroísmo Circular

O espectro de fluorescência revelou que a excitação da SBTX a 280 nm produz uma emissão na região de 290-445 nm (FIGURA 9) com emissão máxima em 332 nm.

O espectro de dicroísmo circular da SBTX classificou esta proteína como pertencente à classe alfa e beta. De fato, o conteúdo de estrutura secundária da SBTX foi estimado em: 35% α -hélice, 13% fitas e folhas β , 27% de volta- β , 25% de estrutura não ordenada e 1% de resíduos aromáticos e pontes dissulfeto (FIGURA 10).

PARTE 2 - Avaliação do Potencial Antifúngico de SBTX

6.6 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Esporos

SBTX foi capaz de inibir a germinação dos esporos dos fungos filamentosos *A. niger* e *P. herquei*, mesmo na concentração mais baixa (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (FIGURAS 11 e 12). A inibição foi monitorada com 12, 16 e 18 h. Ao contrário do observado, efeito inibitório não foi detectado quando utilizados os fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, mesmo na concentração mais alta de SBTX (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (FIGURAS 13 e 14).

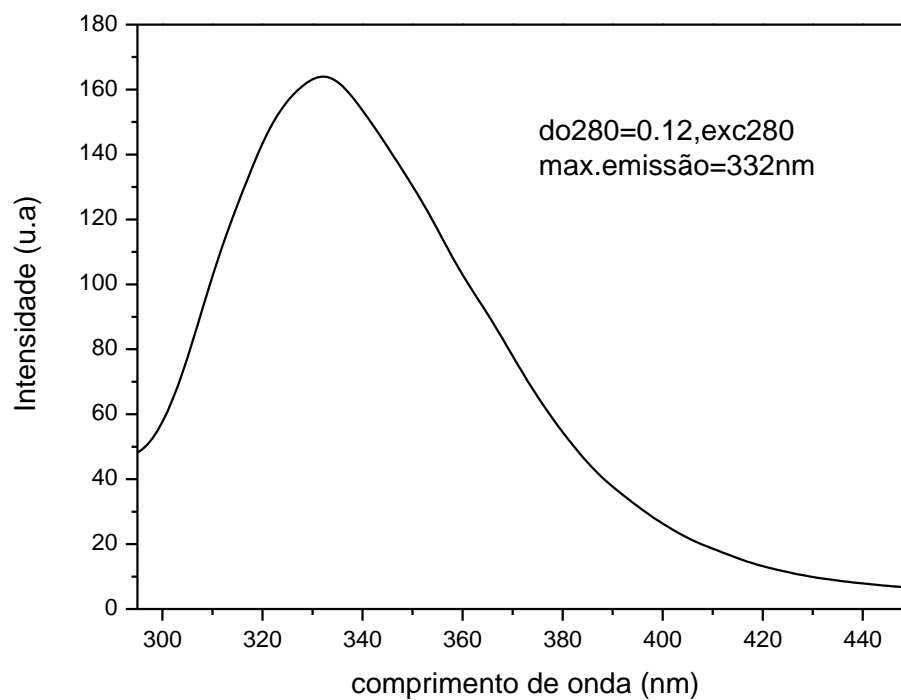


FIGURA 9 - Espectro de fluorescência da SBTX nativa dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (1 mg/mL). A amostra foi excitada em 280 nm e a emissão foi avaliada na faixa de 290 a 450 nm.

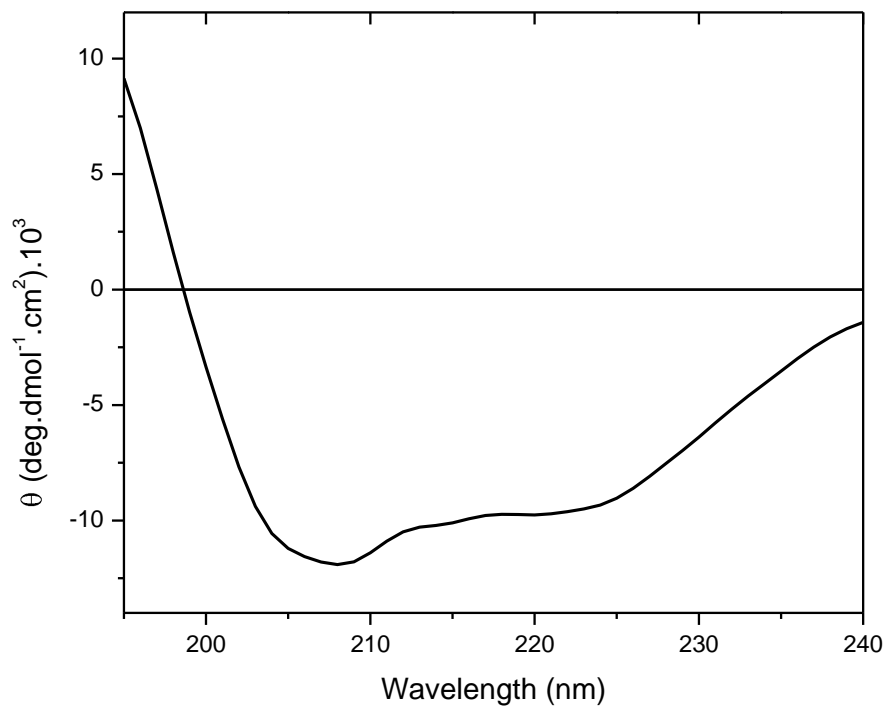


FIGURA 10 - Espectro de dicroísmo circular da SBTX nativa dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (1 mg/mL). O espectro foi registrado no intervalo de 185 a 260 nm.

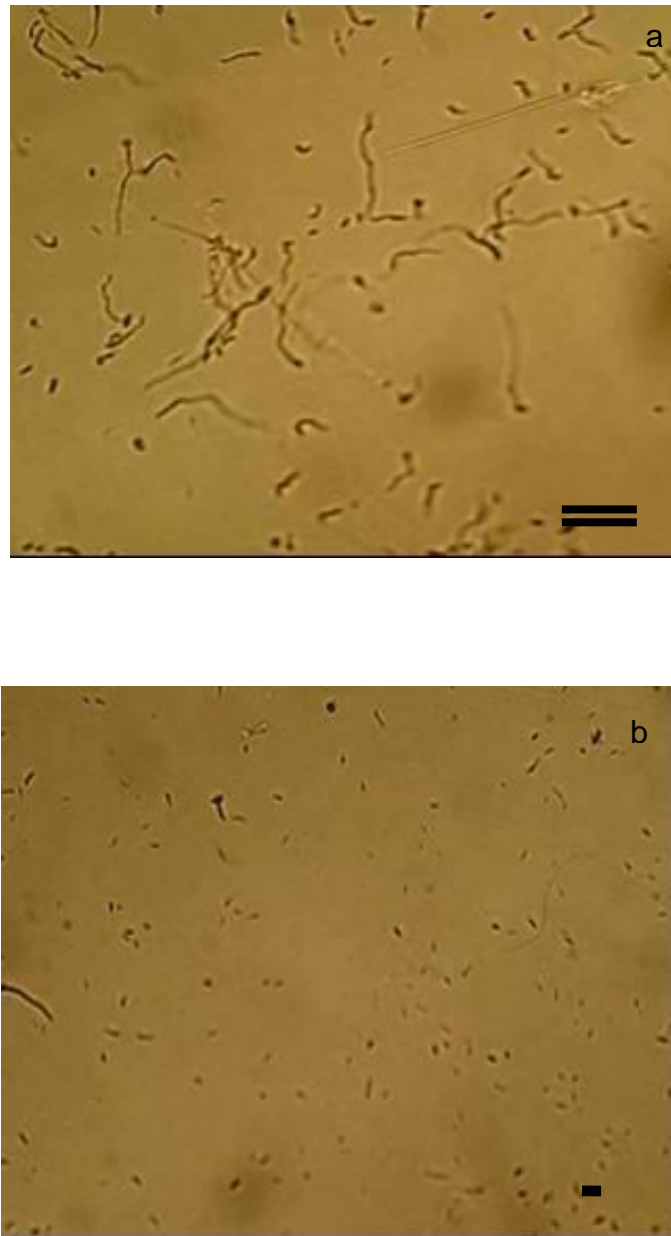


FIGURA 11 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Aspergillus niger*. (A) - Incubação com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e (B) - Incubação com SBTX (100 µgP/mL). Barra = 2,5 µm.

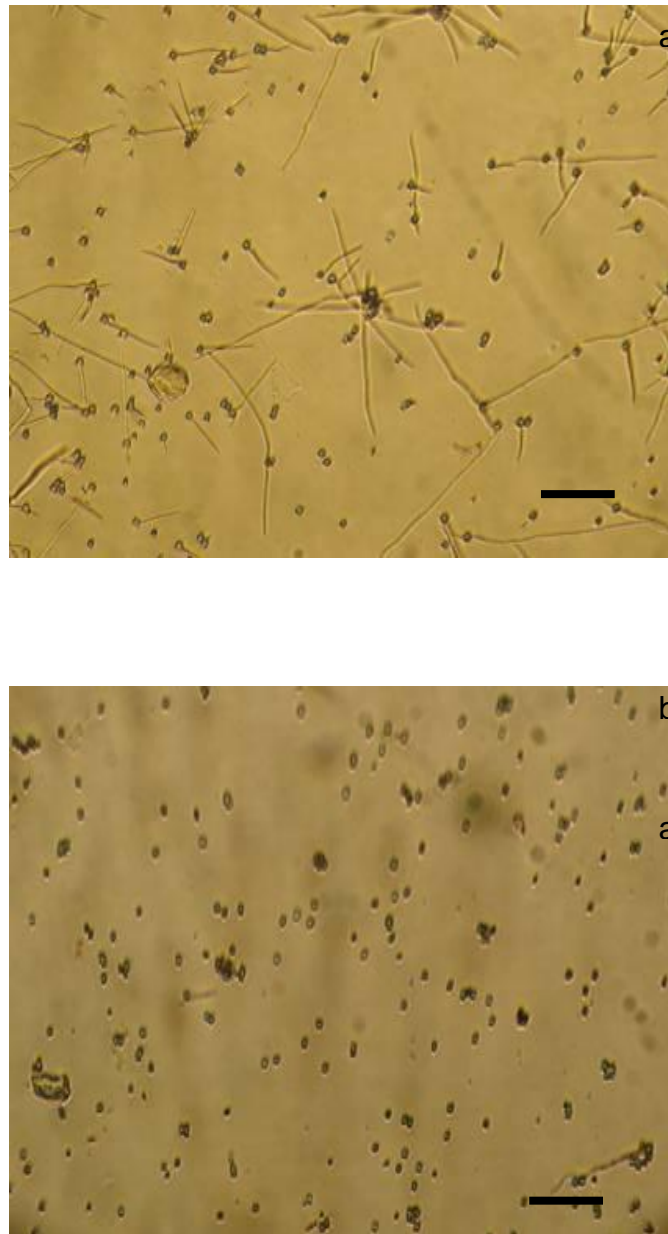


FIGURA 12 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Penicillium herquei*. (A) - Incubação com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e (B) - Incubação com SBTX (100 µgP/mL). Barra = 2,5 µm.

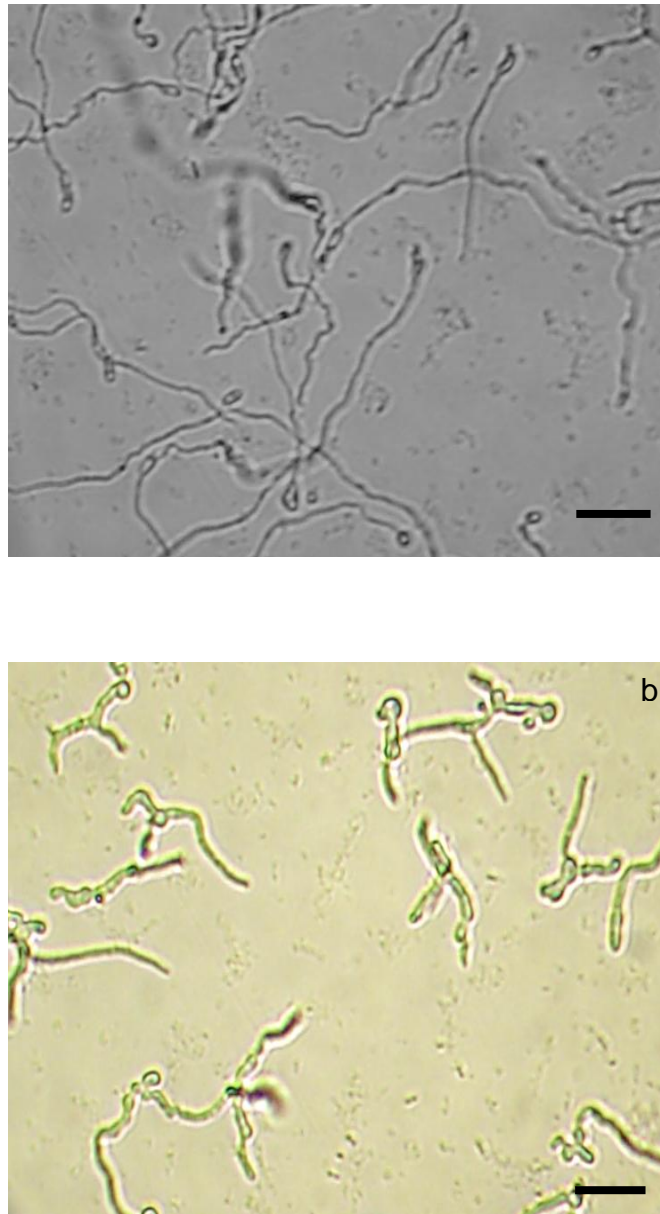


FIGURA 13 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Fusarium oxysporum*. (A) - Incubação com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e (B) - Incubação com SBTX (500 µgP/mL). Barra = 10 µm.

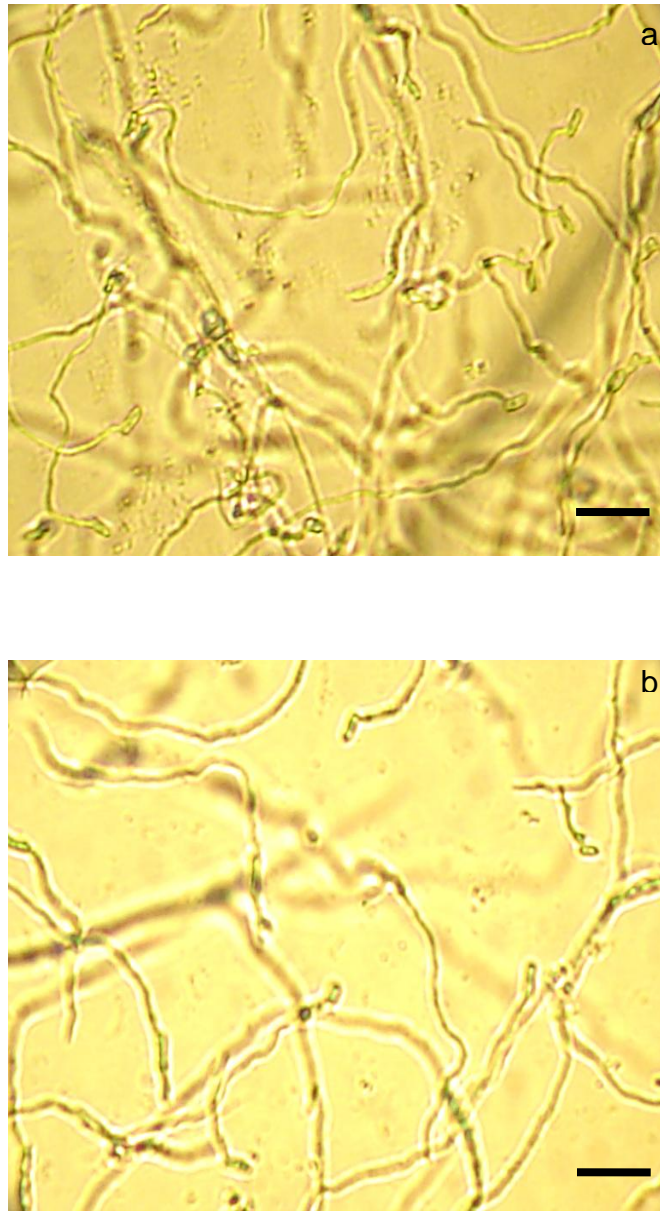


FIGURA 14 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Fusarium solani*. (A) - Incubação com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e (B) - Incubação com SBTX (500 µgP/mL). Barra = 10 µm.

6.7 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade da Membrana de Esporos

Os resultados para o ensaio de permeabilização de membrana utilizando iodeto de propídeo estão mostrados na FIGURA 15. SBTX não foi capaz de causar permeabilização da membrana dos esporos de *A. niger* e *P. herguei*, mesmo na concentração mais elevada (500 µgP/mL), quando comparado ao controle, que consistiu da incubação dos esporos com digitonina 5 mM que, sabidamente, provoca permeabilização de membrana.

6.8 - Avaliações do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Vesículas Fosfolipídicas

SBTX não causou permeabilização em vesículas unilamelares conforme mostrado na FIGURA 16. A incubação das vesículas com a toxina nas concentrações de 9 e 31 µM, na ausência e na presença de cálcio, não resultou em liberação de fluorescência.

6.9 - Avaliações da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido

Os resultados encontrados para os ensaios de avaliação dos efeitos da SBTX sobre o crescimento de hifas dos fungos *A. niger*, *P. herguei*, *F. solani* e *F. oxysporum* estão mostrados nas FIGURAS 17, 18,19 e 20, respectivamente. SBTX não inibiu o crescimento de hifas de nenhum dos fungos testados, quando comparada aos controles (cultivo na presença de peróxido de hidrogênio 100 mM e de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5), nem mesmo na concentração mais elevada (500 µgP/mL),

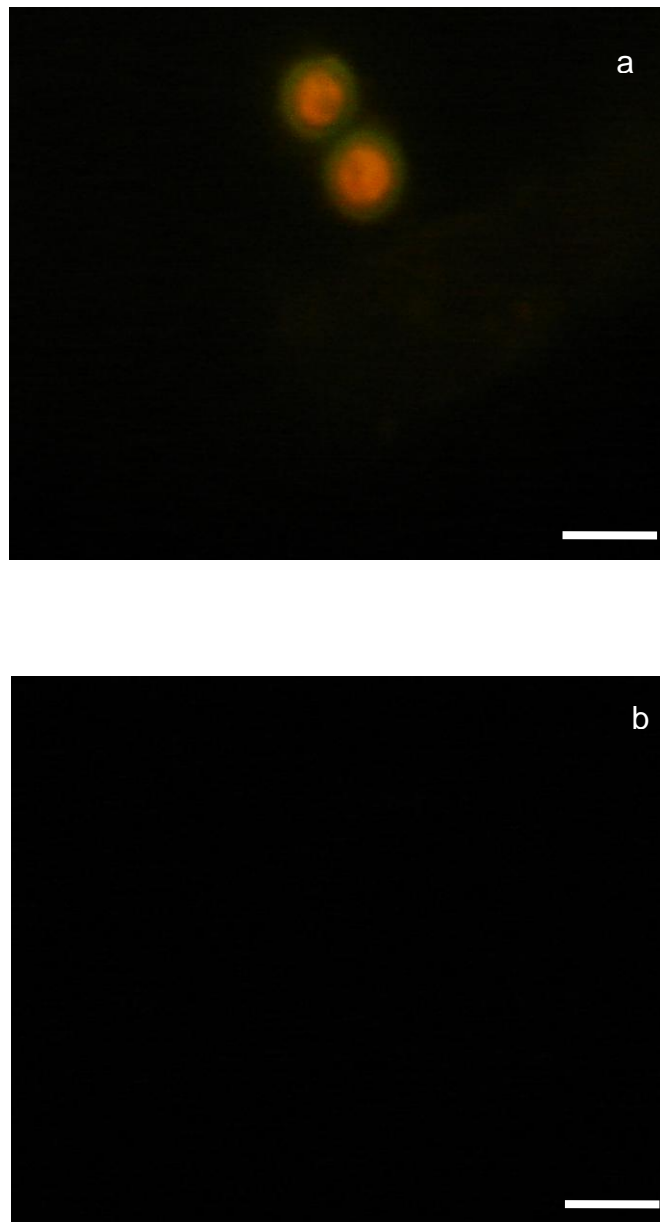


FIGURA 15 - Ensaio de permeabilidade de membrana celular de esporos do fungo *Aspergillus niger*. (A) Esporos incubados por 16 h com digitonina 5 mM. (B) esporos incubados por 16 h com SBTX 500 $\mu\text{gP/mL}$. Os esporos foram visualizados após a incubação, por 30 minutos, com o reagente iodeto de propídeo 1 μM . Barra = 2,5 μm .

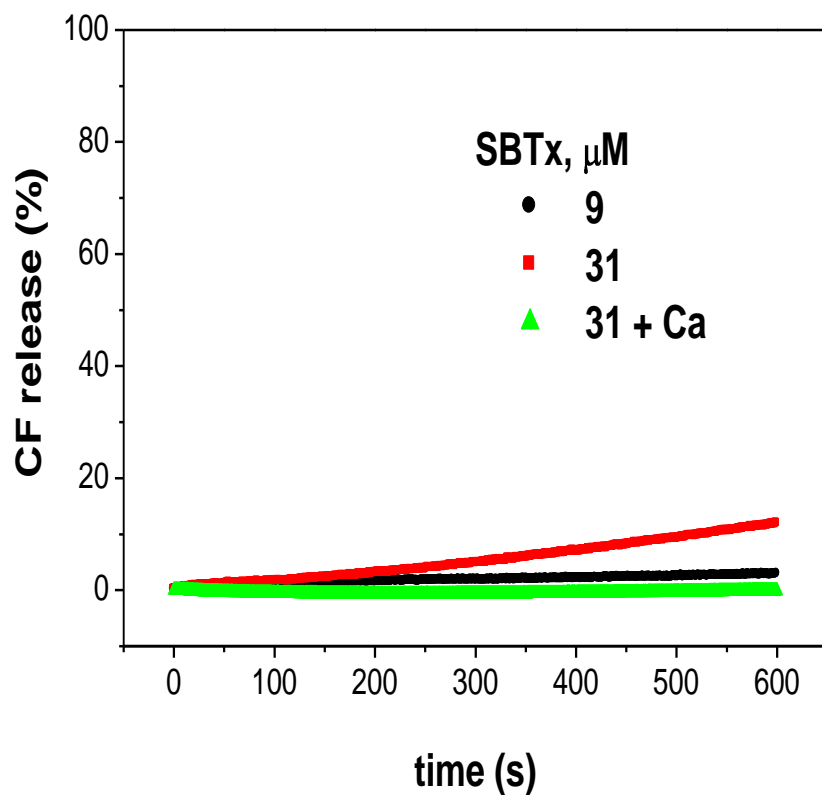


FIGURA 16 - Permeabilização de vesículas unilamelares por SBTX. A composição da vesícula consistia de dioleilfosfatidilcolina 47,5%, esfingomiélna 47,5% e ácido fosfatídico 5%.

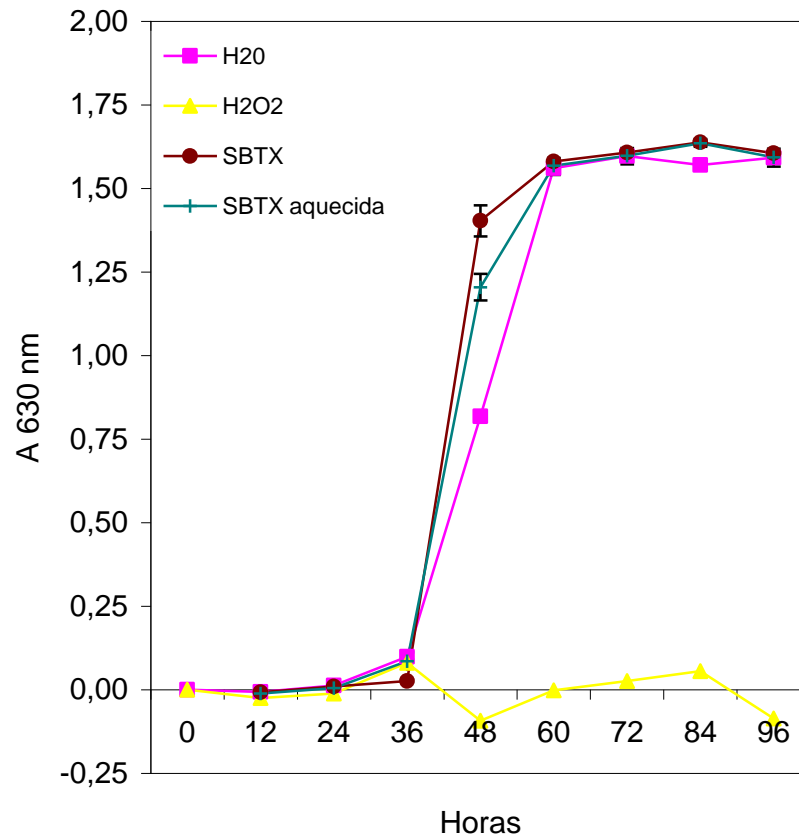


FIGURA 17 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de *Aspergillus niger* por SBTX (500 $\mu\text{gP}/\text{mL}$) em meio líquido (YPD - “yeast potato dextrose”). Controles: H₂O grau Milli-Q estéril e H₂O₂ 100 mM.

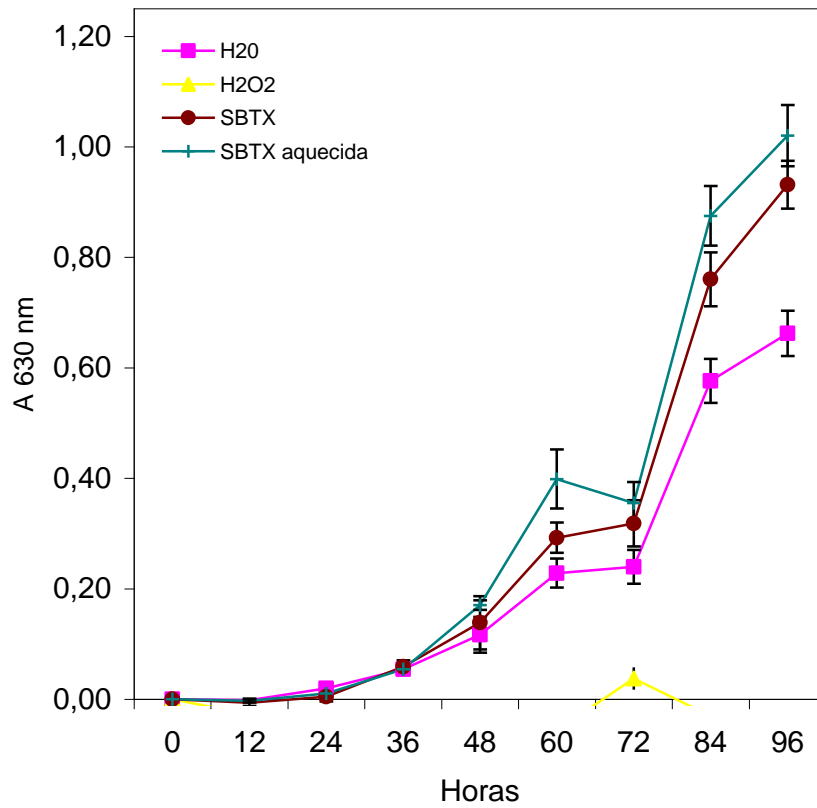


FIGURA 18 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de *Penicillium herguei* por SBTX (500 µgP/mL) em meio líquido (YPD - "yeast potato dextrose"). Controles: H₂O grau Milli-Q estéril e H₂O₂ 100 mM.

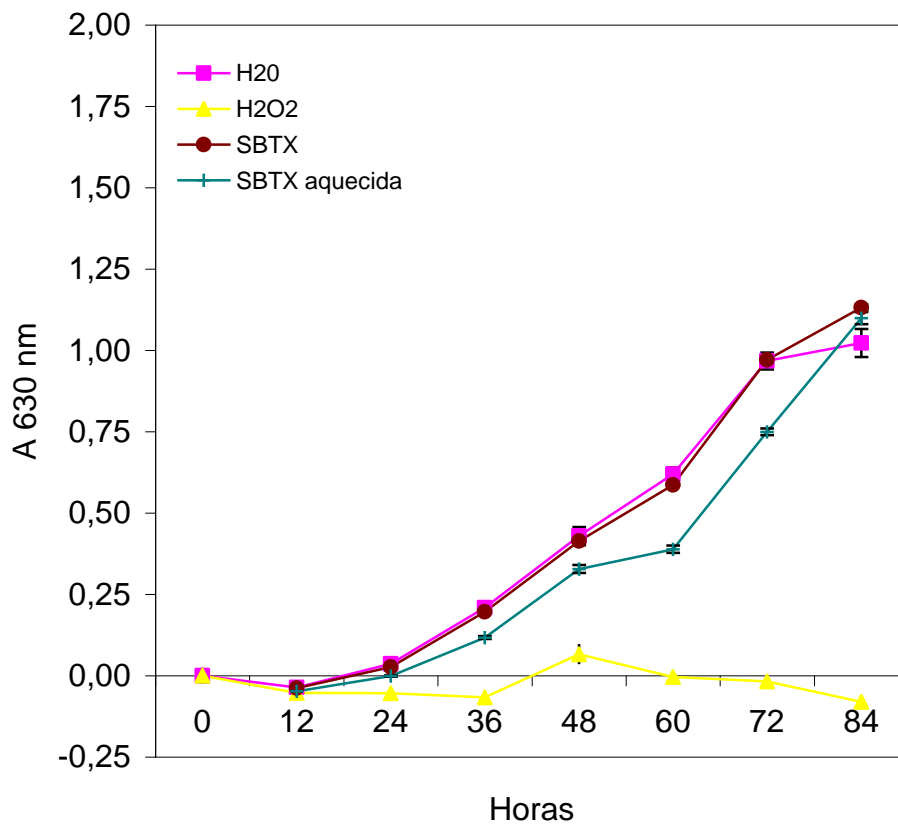


FIGURA 19 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de *Fusarium solani* por SBTX (500 µgP/mL) em meio líquido (YPD - "yeast potato dextrose"). Controles: H₂O grau Milli-Q estéril e H₂O₂ 100 mM.

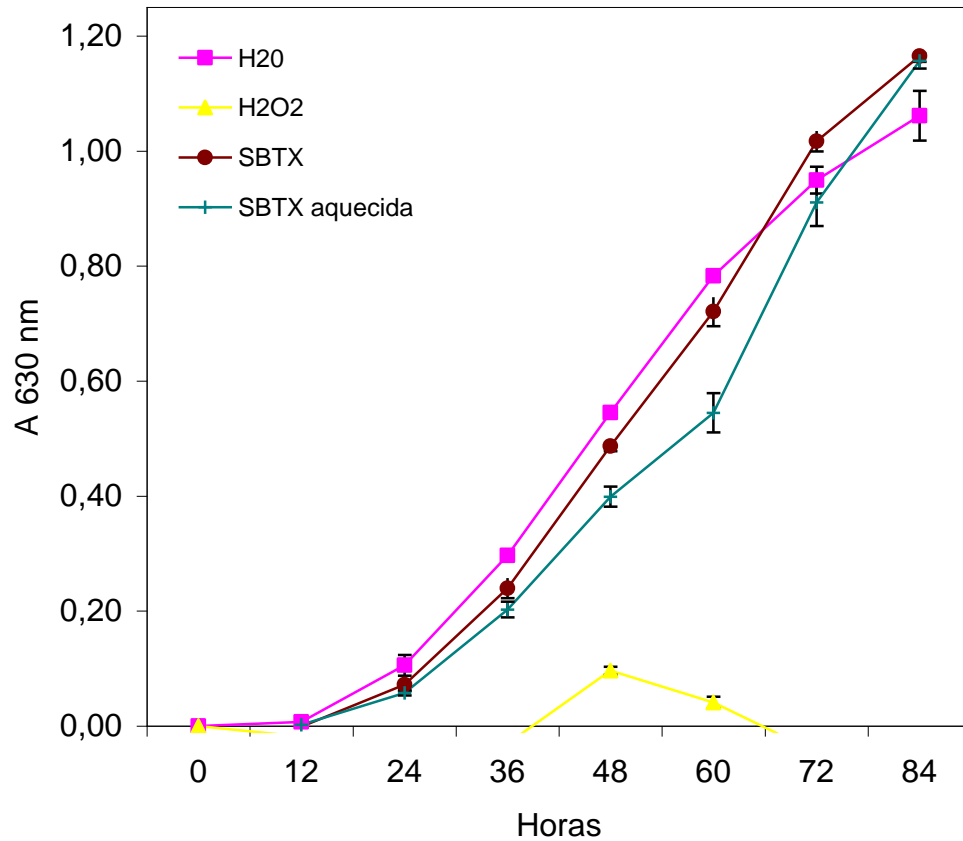


FIGURA 20 - Avaliação da inibição do crescimento das hifas de *Fusarium oxysporum* por SBTX (500 $\mu\text{gP/mL}$) em meio líquido (YPD - “yeast potato dextrose”). Controles: H₂O grau Milli-Q estéril e H₂O₂ 100 mM.

6.10 - Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras

SBTX foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* e *K. marxianus* na concentração de 100 µgP/mL (FIGURAS 21 e 22), quando comparada ao controle, que consistiu de água grau Milli-Q estéril. Todavia, em ensaios usando a mesma concentração, essa toxina não foi capaz de inibir o crescimento de *S. cerevisiae* (FIGURA 23).

6.11 - Microscopia Eletrônica de Varredura

Apesar de terem sido verificadas inibições do crescimento das leveduras *C. albicans* e *K. marxianus*, não foram visualizadas alterações morfológicas nas células, após adição de SBTX (100 µgP/mL), conforme mostram as fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura (FIGURA 24).

6.12 - Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras

SBTX (100 µgP/mL) não foi capaz de causar permeabilização da membrana das leveduras *C. albicans* e *K. marxianus*, conforme avaliação feita usando o corante “SYTOX green”.

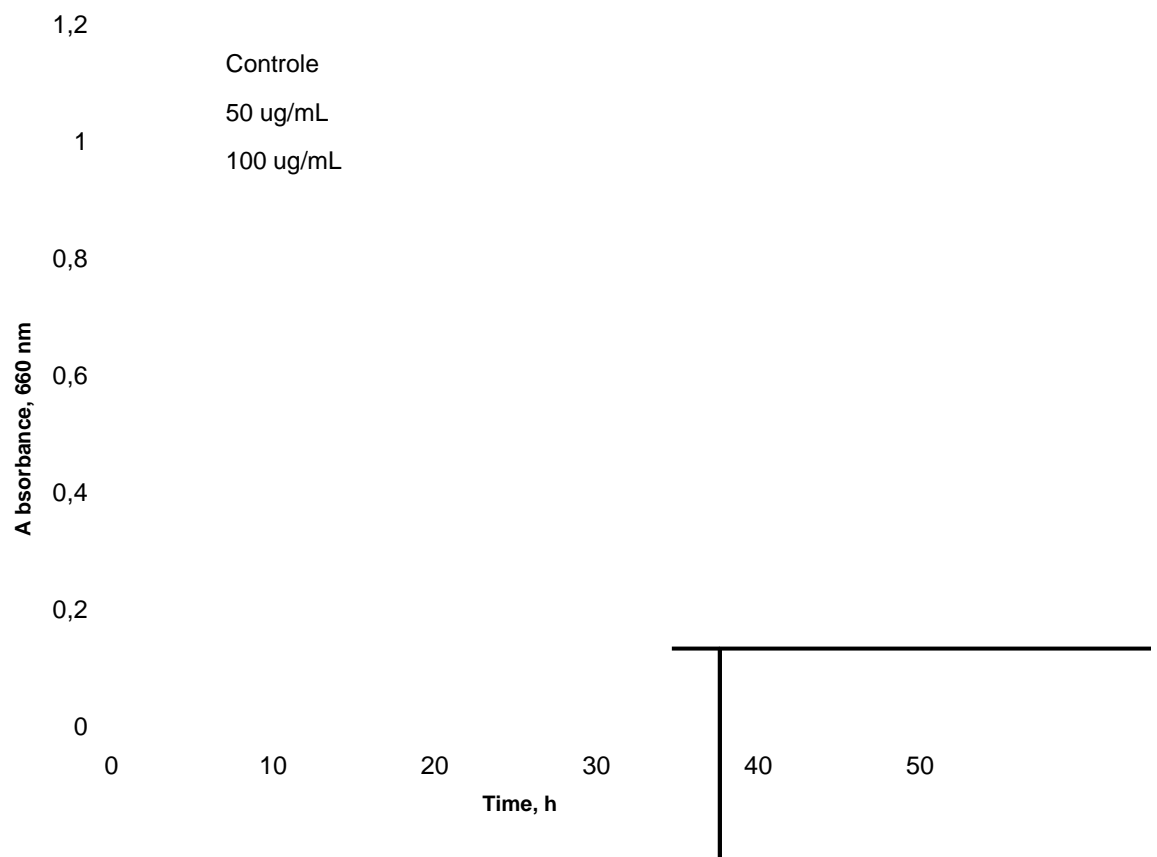


FIGURA 21 - Teste de inibição do crescimento da levedura *Sacharomyces cerevisiae* em meio líquido (YPD - "yeast potato dextrose") por SBTX.

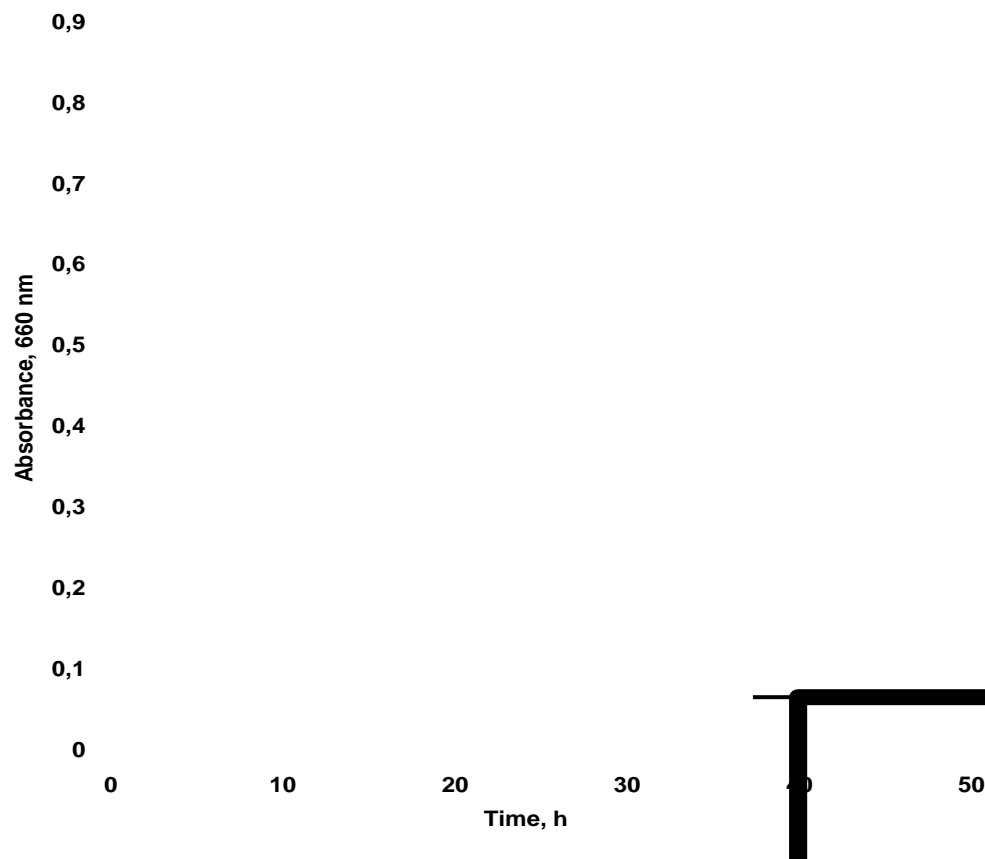


FIGURA 22 - Teste de inibição do crescimento da levedura *Candida albicans* em meio líquido (YPD - “yeast potato dextrose”) por SBTX.

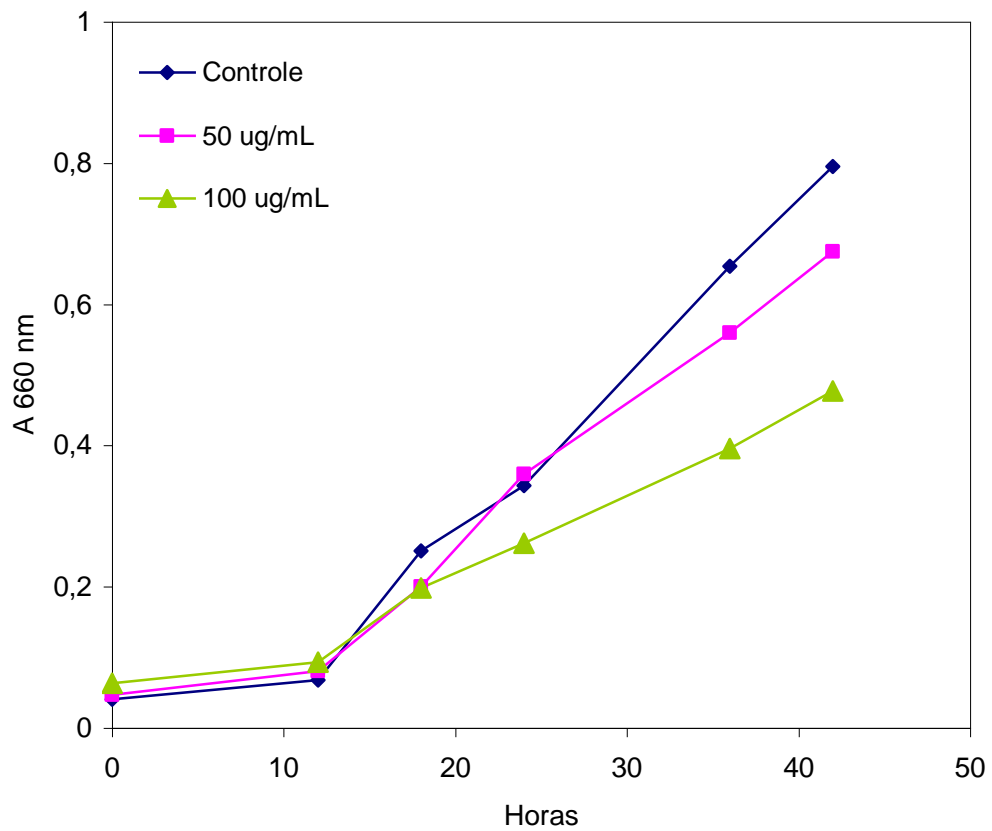


FIGURA 23 - Teste de inibição do crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* em meio líquido (YPD - "yeast potato dextrose") por SBTX.

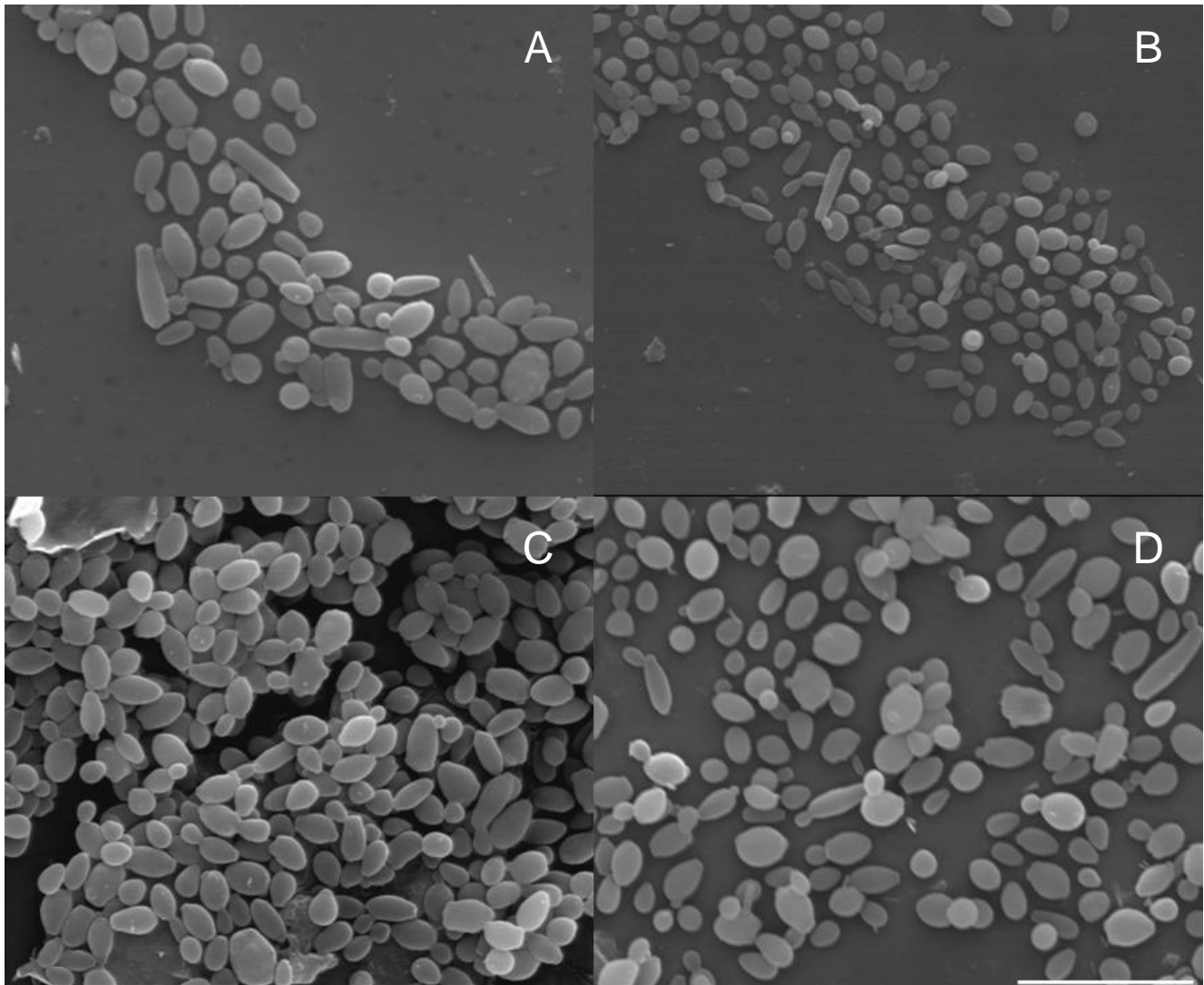


FIGURA 24 - Células de leveduras visualizadas em microscopia eletrônica de varredura. (A) *Candida albicans* controle (sem adição de SBTX); (B) *C. albicans* com SBTX (100 µgP/mL); (C) *Kluyveromyces marxianus* controle (sem adição de SBTX); (D) *K. marxianus* com 100 µgP/mL. A, C e D, Barra = 10 µm; B, Barra = 20 µm.

PARTE 3 - Avaliação da Indução da SBTX por Ácido Jasmônico

6.13 - Avaliação da Morfologia de Sementes de Soja Após Tratamento com Ácido Jasmônico

A FIGURA 25 ilustra sementes de soja que foram embebidas em água grau Milli-Q, etanol 0,05% e ácido jasmônico 30 e 50 μM , por 0, 12 e 24 h. Alterações na morfologia das sementes de soja não foram observadas, quer quando embebidas em água, quer quando submetidas aos tratamentos com etanol e/ou ácido jasmônico. Pelo contrário, todas as sementes submetidas à embebição por 24 h já apresentavam sinais de emissão da radícula.

6.14 - PAGE dos Extratos de Sementes de Soja Submetidas ao Tratamento com Ácido Jasmônico

Análise dos perfis eletroforéticos dos extratos de sementes de soja embebidas em água grau Milli-Q não mostrou diferenças no padrão de expressão das bandas correspondentes a SBTX (FIGURA 26, Raia 2, 3 e 4), entretanto quando as sementes foram embebidas com etanol 0,05% houve uma inibição da expressão de algumas proteínas, particularmente da toxina (FIGURA 26, Raia 7). Aparentemente, o mesmo aconteceu com as sementes tratadas com ácido jasmônico 30 μM preparado em etanol 0,50% (FIGURA 27, Raias 2, 3 e 4). Todavia, quando as sementes foram tratadas com ácido jasmônico 50 μM , preparado em etanol 0,05%, por 12 e 24 h, foi verificado um aumento da intensidade da banda de 44 kDa, massa correspondente àquela da SBTX intacta, bem como de outras proteínas, particularmente no tempo mais prolongado (FIGURA 27, Raia 7). Análise tridimensional dos géis de eletroforese revelou uma redução na intensidade da banda referente à SBTX nos tratamentos com água, etanol e ácido jasmônico 30 μM quando relacionada com o tempo de embebição.

Entretanto o tratamento com ácido jasmônico 50 μM , por 24 h (FIGURA 28, 4L), induziu aumentos de intensidade de 66,4% quando relacionado ao tratamento com água (FIGURA 28, 1C) em 24 h. É bastante provável que essa banda protéica corresponda a SBTX. Se assim for, isso reflete a indução da SBTX pelo ácido jasmônico.

6.15 - Quantificação da SBTX nas Sementes de Soja Submetidas ao Tratamento com Ácido Jasmônico por ELISA

A FIGURA 29 apresenta os teores protéicos de SBTX, detectados por ELISA, em extratos de sementes de soja submetidas aos tratamentos com água grau Milli-Q, etanol 0,05% e ácido jasmônico 30 e 50 μM , usando IgG anti-SBTX. As concentrações de SBTX, detectadas através de reação imunológica com a IgG anti-SBTX, foram maiores para os extratos de sementes embebidas com ácido jasmônico 50 μM , principalmente quando considerado o tratamento por 24 h.

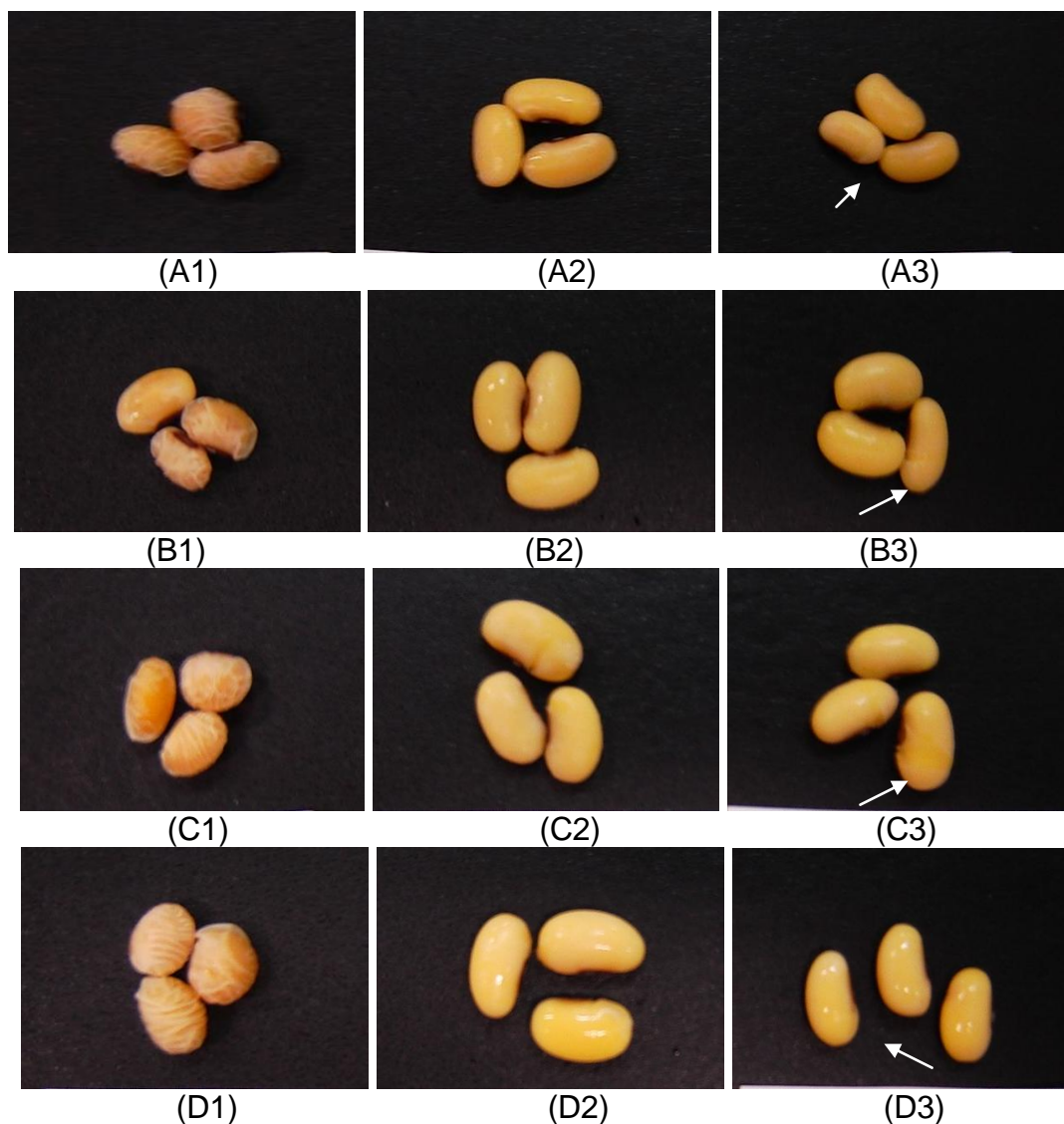


FIGURA 25 - Sementes de soja embebidas em várias soluções. A - Sementes embebidas em água grau Milli-Q estéril por 0 h (A1), 12 h (A2) e 24 h (A3); B - Sementes embebidas em etanol 0,05% por 0 h (B1), 12 h (B2) e 24 h (B3); C - Sementes embebidas em ácido jasmônico 30 μ M preparado em etanol 0,05% por 0 h (C1), 12 h (C2) e 24 h (C3) e D - Sementes embebidas em ácido jasmônico 50 μ M preparado em etanol 0,05% por 0 h (D1), 12 h (D2) e 24 h (D3). As setas apontam para regiões onde ocorre emissão de radícula.

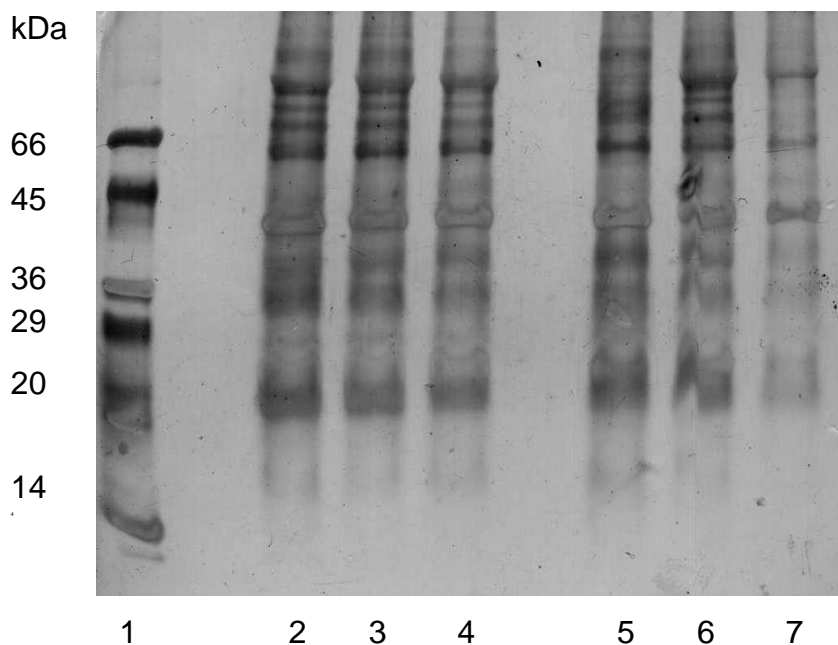


FIGURA 26 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos totais de sementes de soja na presença de SDS 1% e β -mercaptoetanol, revelada com prata. Raia 1 - Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina - 66,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - 36,0 kDa; anidrase carbônica - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa e α -lactoalbumina - 14,2 kDa). Raias 2, 3 e 4 - Extrato de sementes de soja embebidas em água milli-Q estéril por 0, 12 e 24 h, respectivamente. Raias 5, 6 e 7 - Extrato de sementes de soja embebidas em etanol 0,05% por 0, 12 e 24 h, respectivamente.

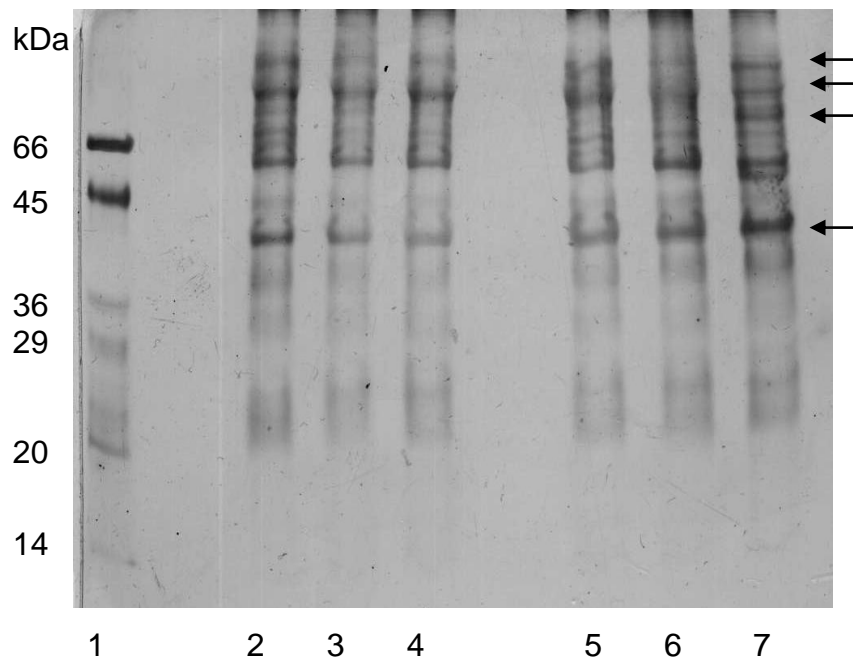


FIGURA 27 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos totais de sementes de soja na presença de SDS 1% e β -mercaptoetanol, revelada com prata. Raia 1 - Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina - 66,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - 36,0 kDa; anidrase carbônica - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa e α -lactoalbumina - 14,2 kDa). Raias 2, 3 e 4 - Extrato de sementes de soja embebidas em ácido jasmônico 30 μ M por 0, 12 e 24 h, respectivamente. Raias 5, 6 e 7 - Extrato de sementes de soja embebidas em ácido jasmônico 50 μ M por 0, 12 e 24 h, respectivamente. Setas indicam para proteínas induzidas com ácido jasmônico 50 μ M por 24 h.

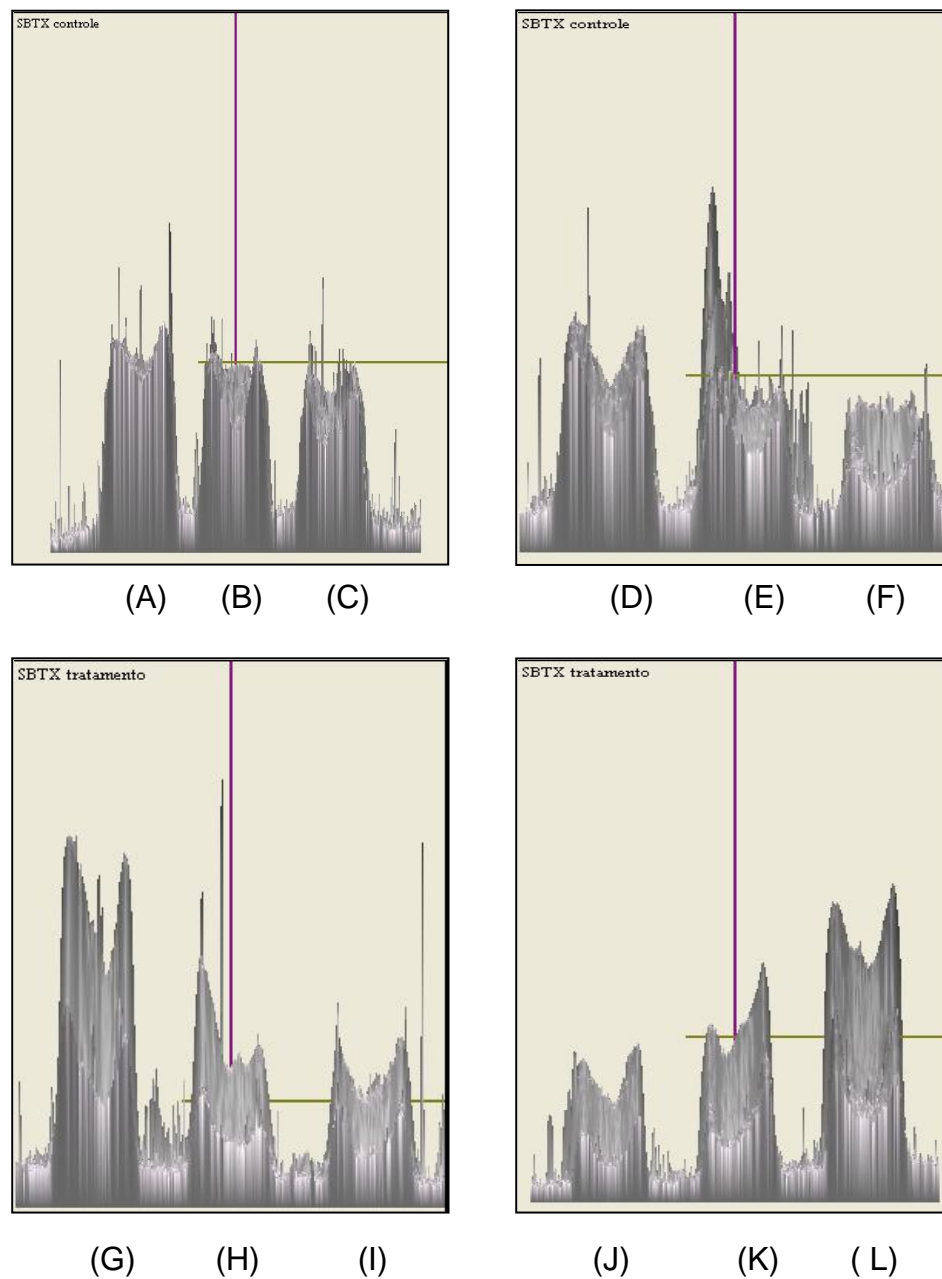


FIGURA 28 - Imagens tridimensionais de PAGE-SDS dos extratos totais de sementes de soja embebidas em água grau milli-Q estéril por 0, 12 e 24 h (A, B e C, respectivamente); em etanol 0,05% por 0, 12 e 24 h (D, E e F, respectivamente); em ácido jasmônico 30 μ M preparado em etanol 0,05% (G, H e I, respectivamente) e em ácido jasmônico 50 μ M preparado em etanol 0,05% (J, K e L, respectivamente).

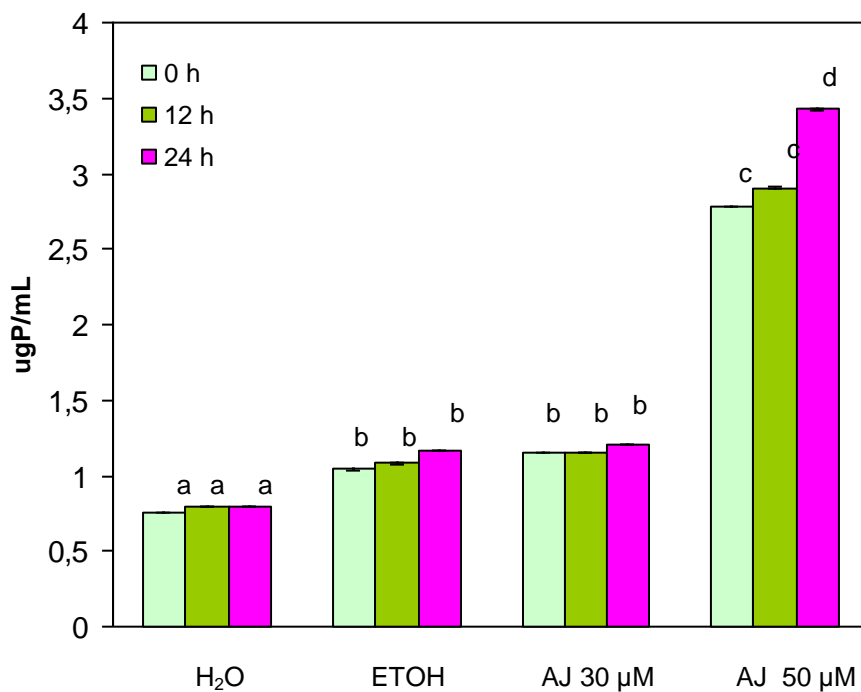


FIGURA 29 - Teores da SBTX em 25 µg/mL de extrato de sementes embebidas em diferentes soluções, detectadas por ELISA, usando IgG anti-SBTX. As soluções utilizadas foram: água grau Milli-Q estéril; etanol 0,05%; ácido jasmônico 30 µM preparado em etanol 0,05% e ácido jasmônico 50 µM preparado em etanol 0,05%. Os tempos de embebição foram 0, 12 e 24 h. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

6.16 - Tissue print

A técnica de *Tissue print*, realizada em cortes de sementes de soja embebidas em ácido jasmônico 50 μM , por 24 h, revelou a presença de SBTX, usando IgG anti-SBTX, na região do hilo, bem como na região referente à emissão da radícula, conforme pode ser visualizado na FIGURA 30.

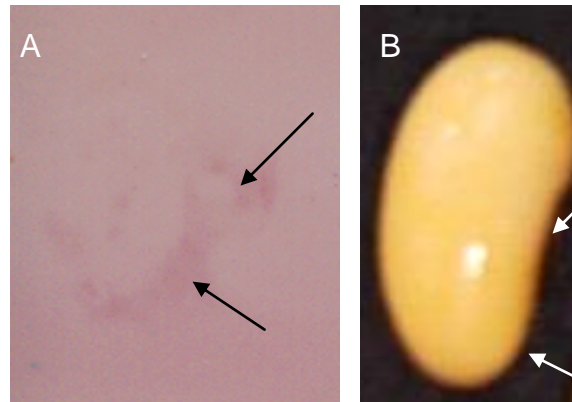


FIGURA 30 - *Tissue print* de sementes de soja embebidas em ácido jasmônico 50 μM preparado em etanol 0,05% por 24 h. As setas em A representam zonas de reconhecimento imunológica quando utilizado o anticorpo anti-SBTX e em B representam zonas referentes ao hilo e a radícula na semente.

7. DISCUSSÃO

Esse trabalho relata a participação da toxina da soja (SBTX) no mecanismo de defesa vegetal. De fato, os dados obtidos de sua seqüência NH₂-terminal, estrutura secundária, capacidade de inibir a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos e, ainda, de sua possível indução por ácido jasmônico reforçam essa idéia.

Ainda que remoto, um indício de que a SBTX poderia estar relacionada com a defesa vegetal, inclusive atuando contra fungos, foi cogitado pelo seu perfil cromatográfico em coluna de CM-Sepharose. SBTX ficou adsorvida nessa matriz, se comportando como uma proteína básica (FIGURA 6). Resultados similares foram observados para mungina, uma proteína do tipo ciclofilina isolada de sementes de *Phaseolus mungo*. Essa proteína também ficou adsorvida a essa matriz e exerceu atividade inibitória frente aos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* (YE e NG, 2000). Ungulina, uma proteína antifúngica do tipo ciclofilina isolada de sementes de *Vigna unguiculata* também exibiu perfil semelhante (YE e NG, 2001). Ademais, outras proteínas antifúngicas de caráter básico já foram isoladas de várias sementes incluindo *P. vulgaris* (XIA e NG, 2005), *Psoralea coryfolia* (YANG *et al.*, 2006), *Pisum sativum* (WANG e NG, 2006a) e *Brassica campestris* (LEE *et al.*, 2007).

As análises voltadas para o conhecimento estrutural da SBTX foram realizadas no sentido de buscar informações mais concretas sobre o papel fisiológico dessa toxina. Assim sendo, tais estudos foram iniciados pela determinação de sua seqüência NH₂-terminal. No entanto, para isso, foi necessário encontrar as condições satisfatórias para separação de suas subunidades, já que dados anteriores apontavam ser a SBTX suscetível ao efeito redutor do β -mercaptoetanol (SIEBRA, 2004). Foram várias tentativas, no entanto, uma dissociação efetiva apenas foi conseguida pelo tratamento da proteína com β -mercaptoetanol 5%, por 15 minutos (FIGURA 8). O tratamento da SBTX com esse agente redutor a 1% não resultou numa separação satisfatória, pois, ora havia uma separação parcial, ora as subunidades não eram separadas. De fato, pontes dissulfeto estabilizam fortemente a estrutura tridimensional de uma proteína (WEDEMEYER *et al.*, 2000), sendo, portanto, difícil de controlar o grau de clivagem dessas pontes (CAYOT *et al.*, 2002). Por exemplo, a proteína lisozima

apenas foi completamente reduzida após sua incubação com DTT 2 mM, a 30 °C, durante 4 h, seguida de uma alquilação com iodoacetamida 6 mM, 30 °C, durante 1 h, na ausência de luz (TOUCH *et al.*, 2004). Provavelmente, a SBTX intacta possui uma ponte dissulfeto intramolecular.

A determinação da seqüência NH₂-terminal mostrou que as bandas protéicas de 44 kDa e 27 kDa exibem a mesma seqüência aminoacídica, diferentemente, entretanto, daquela apresentada pela subunidade de 17 kDa (TABELA 4). A seqüência NH₂-terminal da SBTX intacta e de sua subunidade maior mostrou 80% de identidade com aquela da SC24, uma proteína de 24 kDa purificada a partir de cascas de sementes de soja, com atividade ligante a grupamentos carboxilatos (DHAUBHADEL *et al.*, 2005). Apesar do fato de a SBTX e a SC24 serem duas proteínas presentes em sementes de soja e, ainda, da alta identidade verificada através de suas seqüências NH₂-terminal, há várias propriedades que as caracterizam como proteínas distintas. A SC24 foi caracterizada como uma proteína de casca, com massa molecular aparente de 24 kDa, monomérica, ponto isoelétrico altamente básico e estabilidade frente aos solventes orgânicos etanol e acetona (DHAUBHADEL *et al.*, 2005). Já a SBTX é uma proteína de 44 kDa, formada por duas subunidades distintas, uma delas apresentando pI básico e a outra ácido e altamente instável na presença de etanol. Um outro dado relevante é que o extrato total obtido a partir de sementes de soja destegumentadas continuou tóxico para camundongos, tendo os animais apresentado a mesma sintomatologia verificada quando da administração do extrato total oriundo de sementes de soja íntegras ou da SBTX. Além disso, extrato total das cascas de sementes de soja não foi letal para camundongos, por via i.p., mesmo quando administrado em doses equivalentes a DL₅₀ do extrato total obtido a partir das sementes de soja íntegras.

A seqüência NH₂-terminal da subunidade de 17 kDa não revelou qualquer similaridade com a proteína SC24. Por outro lado, essa cadeia apresentou um domínio característico das ciclofilinas (TABELA 4). Identidades de 96%, 88% e 87% foram encontradas com as ciclofilinas de *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* e *Digitalis lanata*, respectivamente. Embora as seqüências NH₂-terminal da subunidade de 17 kDa e da ciclofilina de soja tenham

apresentado uma elevada similaridade, é importante ressaltar que a preparação de SBTX não estava contaminada com a ciclofilina de soja, uma vez que eletroforeses nativa e em condições desnaturantes, porém na ausência de β -mercaptoetanol, mostraram a presença de apenas uma banda. A banda de 17 kDa foi resultante do tratamento da SBTX com o agente redutor. Ademais, as propriedades apresentadas pela SBTX não foram relatadas para a ciclofilina de soja. Dessa forma, pode ser sugerido que a SBTX se trata de uma proteína “ciclofilina-like”. As ciclofilinas catalisam a isomerização cis-trans de ligações amidas precedendo resíduos de prolina em peptídeos e proteínas e, também, podem ter um papel importante no arranjo tridimensional de proteínas e em interações distantes entre células (PLIYEV e GURVITS, 1999). Dessa forma, é razoável se especular que esse domínio estrutural característico das ciclofilinas seja necessário para acelerar o dobramento da SBTX logo após a sua síntese. Uma alternativa também estaria relacionada com a atividade antioxidante intrínseca das ciclofilinas (LEE *et al.*, 2001), dando suporte à importância dos grupos tióis para a atividade tóxica da SBTX. Além das propriedades citadas, uma outra função atribuída às proteínas ciclofilinas-like está ligada à defesa vegetal, por exibirem atividade antifúngica (YE e NG, 2000, 2001; SELITRENNIKOFF, 2001). Essa função vai ao encontro da proposta deste trabalho, que é avaliar a participação da SBTX no mecanismo de defesa da planta.

Uma outra abordagem estrutural realizada neste estudo teve como objetivo a estimativa da estrutura secundária da SBTX por dicróismo circular. Primeiramente foi realizado o espectro de fluorescência para verificar se a SBTX estava em sua forma nativa. O espectro obtido revelou que a excitação da SBTX a 280 nm promovia uma emissão na região de 290-450 nm, com um máximo em 332 nm (FIGURA 9), o que é típico de contribuições de resíduos de triptofano enterrados no interior da molécula (BURSTEIN *et al.*, 1973; EFTINK, 1991). Os resultados obtidos sugeriram que a proteína estava em sua estrutura nativa, pois o triptofano sendo um aminoácido hidrofóbico encontra no interior da proteína o seu ambiente natural. Em seguida, foi procedida a medida do espectro de dicróismo circular da SBTX, que classificou essa proteína como sendo pertencente à classe alfa e beta, diante do conteúdo de estrutura secundária estimado em 35% de α -

hélice e 13% de fitas e folhas β (FIGURA 10). Resultados similares foram encontrados para a canatoxina, tratando-se, também, de uma proteína pertencente à classe alfa e beta, tendo seu conteúdo de estrutura secundária estimado em 27% de α -hélice e 22% de fitas e folhas β (dados ainda não publicados). Canatoxina é uma proteína neurotóxica isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (CARLINI e GUIMARÃES, 1981), tendo sido atribuído o seu papel na defesa vegetal, haja vista à sua atividade inseticida (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; STANIÇUASKI *et al.*, 2005). Além de proteínas, peptídeos antimicrobianos exibem também uma estrutura secundária rica em α -hélice e folhas β , podendo interagir seletivamente com a membrana de microrganismos por interações eletrostáticas (MATSUZAKI, 1999; SHAI, 1999).

Havendo indícios de que a SBTX poderia ter participação na defesa vegetal, a próxima etapa consistiu da avaliação de seu potencial antifúngico. SBTX não foi capaz de inibir o crescimento das hifas dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium herguei*, *Fusarium solani* e *F. oxysporum* (FIGURAS 17 a 20), nem mesmo quando utilizada uma alta concentração dessa proteína (500 μ gP/mL). No entanto, SBTX inibiu a germinação dos esporos de *A. niger* e *P. herguei* numa concentração dez vezes menor (FIGURAS 11 e 12). Estudos realizados por Gifoni (2005) mostraram que proteínas ligantes à quitina, presentes em sementes de *Moringa oleifera*, não foram capazes de inibir o crescimento das hifas dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. lindemunthianum*, *F. solani* e *Rizhoctonia solani*, mesmo quando utilizado 1 mgP/mL, mas inibiram a germinação dos esporos desses fungos em uma concentração de 500 μ gP/mL, portanto, dez vezes maior do que aquela de SBTX usada neste estudo. Por outro lado, efeito inibitório apenas no crescimento das hifas, mas não na germinação dos esporos, também já foi observado. Melo e colaboradores (2005) verificaram que a lectina (250 μ gP/mL) de *Luetzelburgia auriculata* foi capaz de inibir o crescimento das hifas dos fungos *C. lindemunthianum*, *F. solani* e *A. niger*, muito embora não tenha apresentado qualquer efeito sobre a germinação dos esporos. Há, ainda, proteínas ou peptídeos que se mostraram ativos apenas para algumas espécies de fungos. Por exemplo, uma PR10 recombinante de *Arachis hypogaea* exibiu efeito inibitório sobre o crescimento das hifas de *F. oxysporum* e *R. solani*,

entretanto não se mostrou ativa para *Sclerotium rolfsii*, *A. flavus*, *A. niger* e *Phytophthora infestans*. As concentrações de proteína necessárias para inibir 50% do crescimento fúngico foram 12,5 e 100 µgP/mL para o *F. oxysporum* e *R. solani*, respectivamente (CHADHA e DAS, 2006).

É sabido que a composição química da parede celular dos fungos pode variar dependendo se forem analisados o soma (hifa ou levedura), as estruturas reprodutivas (esporangióforos) ou os esporos (BARTINIK-GARCIA, 1968). De fato, Feofilova *et al.* (2006) demonstraram que o conteúdo e a composição dos polissacarídeos estruturais (complexo quitina-glucano) presentes na parede celular de *Aspergillus niger* se alteram durante o desenvolvimento. Os conteúdos mais elevados do complexo foram encontrados no micélio maduro e os menores no esporo. Ademais, quitina é o polissacarídeo dominante na fase de esporo, enquanto que o micélio contém mais glucano. Assim, é possível que o efeito inibitório da SBTX, observado apenas sobre os esporos dos fungos *A. niger* e *P. hergueli*, seja devido a essa diferença na composição da parede celular.

Sabendo-se que SBTX é uma proteína pertencente à classe alfa e beta e que alguns peptídeos antimicrobianos apresentam estrutura secundária semelhante, atuando em membranas, o efeito da SBTX sobre a permeabilidade da membrana dos esporos foi avaliado. Não apenas peptídeos (ABAD *et al.*, 1996; THEVISSEN *et al.*, 1999; GIUDICI *et al.*, 2004), mas algumas proteínas (THEIS *et al.*, 2003; AGIZZIO *et al.*, 2006) também exercem seu efeito inibitório sobre fungos por causarem permeabilização na membrana e influxo de íons, resultando em despolarização (SELITRENNIKOFF *et al.*, 2001). Para examinar essa mudança na permeabilidade, iodeto de propídeo foi utilizado, por ser um corante com alta afinidade para ácido nucléico (DNA) que, facilmente, penetra em células com a membrana plasmática comprometida, o que não ocorre em membrana intacta. Além disso, foram utilizadas como modelo de membrana, vesículas fosfolipídicas unilamelares. SBTX não causou permeabilização dessas vesículas, mesmo em elevada concentração (FIGURA 16). Muito embora esse modelo forneça evidências referentes à interação da substância-teste com a membrana e, conseqüente, permeabilização (SHAI, 1999), um outro ensaio foi efetuado, onde a própria membrana dos esporos foi analisada. SBTX também não foi capaz de

alterar a permeabilidade de membrana dos esporos, nem mesmo daqueles em que essa toxina teve efeito inibitório (FIGURA 15).

Ainda na tentativa de aprofundar o conhecimento sobre o efeito antifúngico da SBTX, bem como de se ter evidências sobre o mecanismo de ação pelo qual essa toxina estaria atuando, células de levedura foram escolhidas como um outro modelo experimental. Células de leveduras são mais fáceis de serem manipuladas, sua parede celular é permeável a dextranas com 70 kDa, sendo constituída também pelos polissacarídeos estruturais β -1,3-glucana, β -1,6-glucana e quitina (NOBEL *et al.*, 1989). No primeiro momento, foi avaliado o efeito da SBTX sobre o crescimento das leveduras *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus* e *Sacharomyces cerevisiae*. SBTX (100 μ gP/mL) inibiu o crescimento de *C. albicans* e *K. marxianus*, mas não o de *S. cerevisiae* (FIGURAS 17, 18 e 19). Inibição do crescimento de *S. cerevisiae* foi evidenciada pela lectina de *Luetzelburgia auriculata*, porém numa concentração cinco vezes maior (MELO *et al.*, 2005). Uma proteína de 30 kDa isolada de *Sorghum bicolor* também mostrou efeito inibitório sobre o crescimento de *C. albicans*, apresentando concentração inibitória mínima de 18 μ gP/mL. Apesar da SBTX ter sido capaz de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* e *K. marxianus*, permeabilização de membrana e alteração morfológica nessas células não foram detectadas (FIGURA 24), diferentemente da proteína antifúngica de *S. bicolor*, que promoveu espessamento da parede celular, redução do tamanho das células, alteração no espaço entre a parede e a membrana celular e deformação celular (MINCOFF *et al.*, 2006).

Embora não haja dados concretos sobre o mecanismo de ação pelo qual a SBTX exerce sua ação antifúngica, os resultados obtidos excluem a possibilidade de ser por aumento da permeabilidade de membrana. Todavia, há outras possibilidades. Uma delas, seria por ação direta da SBTX na parede celular, que tem a função de proteger o organismo contra condições hostis, possuindo uma série de enzimas associadas à sua síntese e manutenção, além de servir para o alojamento de transportadores de nucleotídeos e proteínas (RAST *et al.*, 2003). A outra possibilidade envolveria a internalização da SBTX que, por sua vez, atuaria em um alvo intracelular. De fato, um número expressivo de

proteínas tóxicas vegetais possui alvos intracelulares, se sobressaindo as que possuem um motivo que se liga na superfície celular e um outro motivo que penetra no citosol onde , irá exercer o seu efeito (SANDVIG *et al.*, 2002). Chadha e Das (2006) demonstraram que uma PR10 de *A. hypogaea* somente foi capaz de exercer sua atividade contra *F. oxysporum* e *R. solani* após ter sido internalizada, exibindo atividade ribonucleásica. Todavia, os estudos com fungos prosseguem no sentido de definir o mecanismo de ação da SBTX.

Sabendo-se que o ácido jasmônico é um tipo de hormônio envolvido com as respostas de defesa da planta (BRUINSMA *et al.*, 2007) e que a sua aplicação exógena aumenta a expressão de muitos genes relacionados com essas respostas (WILLMANN, 2002), principalmente daqueles envolvidos com a expressão de proteínas de defesa, o último passo neste trabalho foi avaliar se a SBTX seria induzida por esse elicitor. É importante salientar que o tratamento das sementes com ácido jasmônico 30 e 50 μM não causou, aparentemente, alterações morfológicas das sementes (FIGURA 25), mantendo sua capacidade germinativa. De acordo com essa observação, Maia *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento de sementes de soja com ácido jasmônico, nas concentrações de 20, 30 e 50 μM , não alterou a germinação das sementes. Todavia, há evidências de que a SBTX teve seus níveis aumentados, particularmente quando as sementes foram embebidas com ácido jasmônico 50 μM , por 24 h, conforme evidenciado por PAGE-SDS (FIGURAS 27 e 28). Esse efeito foi dose-dependente. Corroborando com esses dados estão os resultados obtidos por ELISA (FIGURA 29) e o *Tissue print* (FIGURA 30). A rigor, os estudos centrados na indução de proteínas através do tratamento de sementes com ácido jasmônico ainda são poucos, principalmente quando se trata da soja. Um dos poucos trabalhos conduzidos com sementes de soja mostra a indução gradativa das atividades fosfatásica ácida e α -amilásica em sementes tratadas com doses crescentes (0, 20, 30 e 50 μM) de ácido jasmônico (MAIA *et al.*, 2000). Ainda em sementes, porém de melão, foi detectado um aumento nas atividades quitinásica e peroxidásica após terem sido embebidas em ácido jasmônico 45 μM , por 12 h (BUZI *et al.*, 2004). No entanto, a aplicação de jasmonato em outros tecidos vem sendo, cada vez mais, relatada na literatura. Por exemplo, o tratamento de folhas

de arroz com ácido jasmônico 50 μ M induziu a síntese *de novo* de proteínas incluindo um inibidor de proteinase de 28 kDa, uma PR-1 de 17 kDa e uma PR-5 de 19 kDa (RAKWAL *et al.*, 1999; RAKWAL e KOMATSU, 2000; AGRAWAL *et al.*, 2002). Indução de proteínas também foi observada em cevada, quando segmentos de folhas foram tratados com ácido jasmônico 45 μ M (WASTERNAK e PARTHIER, 1997). Folhas de plântulas de amendoim tratadas com ácido jasmônico 250 μ M resultaram na indução de uma PR-1, uma proteína sabidamente dotada de atividade antifúngica (KUMARI *et al.*, 2006). Por outro lado, tem sido mostrado que muitas das respostas oriundas do tratamento com ácido jasmônico podem ser alteradas por outros compostos. Por exemplo, as cascatas de sinalização envolvendo os ácidos salicílico e jasmônico são mutuamente antagonistas (KUNKEL e BROOKS, 2002). De fato, um inibidor de proteinase induzido por ácido jasmônico teve sua síntese inibida pelo ácido salicílico (FARMER *et al.*, 2003). Dessa forma, uma outra possibilidade de dar continuidade às investigações aqui iniciadas seria avaliar o comportamento da SBTX diante do tratamento das sementes com ácido salicílico, e verificar se respostas antagônicas aconteceriam, quando comparada àquelas obtidas com ácido jasmônico, conforme tem sido descrito na literatura.

8. CONCLUSÃO

A toxina da soja é forte candidata a integrar o sistema de defesa da soja. Os dados a favor desta afirmativa são: 1) A alta similaridade existente em suas seqüências primária e secundária com outras proteínas reconhecidamente com função de defesa; 2) A sua atividade inibitória para fungos fitopatogênicos e 3) A sua indução por ácido jasmônico, um hormônio vegetal que, sabidamente, induz respostas de defesa na planta.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, L. R., D'URZO, M. P., LIU, D. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma permeabilization. **Plant Science**, v. 118, p. 11-23, 1996.

AGIZZIO, A. P., DA CUNHA, M., CARVALHO, A. O., OLIVEIRA, M. A., RIBEIRO, S. F. F., GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171 (4), p. 515-522, 2006.

AGRAWAL, R., RAKWAW, R., JWA, N. S. Cloning and characterization of a jasmonate inducible rice (*Oryza sativa* L.) peroxidase gene, *OsPOX*, against global signaling molecules and certain inhibitors of kinase-signaling cascade(s). **Plant Science**, v. 162, p. 49-58, 2002.

AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens. In **Plant Pathology**. London, Academic Press. 1996, p. 97-115.

AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego. 1997, p. 635.

ANDERSON, J. M., SPILATRO, S. R., KLAUER, S. F., FRANCESCHINI, V. R. Jasmonic acid dependent increase in the level of vegetative storage protein in soybean. **Plant Science**, v. 62, p. 45-52, 1989.

ARIMURA, G., KOST, C., BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defenses. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1734 (2), p. 91-111, 2005.

ASSUNÇÃO, I. P., MICHEREFF, S. J., MIZUBUTI, E. S. G., BROMMONSCHENKEL, S. H. Influência da intensidade da murcha de fusário no rendimento do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 615-619, 2003.

BABU M. R., SAJEENA A., SEETHARAMAN K., REDDY M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management. **Crop Protection**, v. 22 (9), p. 1071-1086, 2003.

BARTINICK-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 22, p. 87-108, 1968.

BERGAMIN FILHO, A., KIMATHI, H., AMORIM, L. Fisiologia do parasitismo. Manual de Fitopatologia, 3^a. ed., p. 343-414, 1995.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOMAN, H. G. Innate immunity and the normal microflora. **Immunological Review**, v.173, p. 5-16, 2000.

BONATO, E. R., BONATO, A. L. V. A Soja no Brasil: História e Estatística. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, v. 1, p. 61, 1987.

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.

BRADLEY, D. J., KJELLBOM, P., LAMB, C. Elicitor- and wound induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. **Cell**, v. 70, 21-30, 1992.

BROEKAERT, W.F., TERRAS, F. R. G., CAMMUE, B. P. A., VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69 (2) p. 55-59, 1990.

BRUINSMA M., VAN DAM N. M., VAN LOON J. J. A., DICKE M. Jasmonic acid-induced changes in *Brassica oleracea* affect oviposition preference of two specialist herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 655-668, 2007.

BURSTEIN, E. A., VEDENKINA, N. S., IVKOVA, M. N. Fluorescence and location of tryptophan residues in protein molecules. **Photochemistry Photobiology**, v. 18 (4), p. 263-279, 1973.

BUZI, A., CHILOSI, G., DE SILLO, D., MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-s-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, v. 152 (1), p. 34-42, 2004.

CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, p. 667-676, 1981.

CARLINI, C. R., BARCELLOS, G. B. S., BAETA-NEVES, A. D. V., GUIMARÃES, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins from leguminous seeds. **Phytochemistry**, v. 27, p. 25-30, 1988.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CASSAB, G. I., VARNER, J. E. Cell wall proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 321-353, 1988.

CAYOT, P., ROSIER, H., ROULLIER, L., HAERTLE, T. TAINURIER, G. Electrochemical modifications of proteins: disulfide bonds reduction. **Food Chemistry**, v. 77, p. 309-315, 2002.

CHADHA, P., DAS, R. H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. **Planta**, v. 225 (1), p. 213-222, 2006.

CHAUDHRY, B., MULLER-URI, F., CAMERON-MILLS, V., GOUGH, S., SIMPSON, D., SKRIVER, K., MUNDY J. The barley 60kD jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome inactivating protein. *Plant Journal*, v. 6, p. 815-824, 1994.

CHU, E. Y., MÖLLER, M. R. F., CARVALHO, J. G. Efeitos da inoculação micorrízica em mudas de gravioleira em solo fumigado e não fumigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36 (4), p. 671- 680, 2001.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Safras. Disponível em
<<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Soja>> Acesso em 20 dez. 2006.

COSIO, E. G., FEGER, M., MILLER, C. J., ANTELO, L., EBEL, J. High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. **Planta**, v. 200 (1), p. 92-99, 1996.

CREELMAN, R. A., TIERNEY, M. L., MULLET, J. E. *Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89 (11), p. 4938-4941, 1992.

DEACON, J. W. *Modern Micology*. Blackwell Science, London, 3^a ed. 1997, 303p.

DHAUBHADEL, S., KUFLU, K., ROMERO, M. C., GIJZEN, M. A soybean seed protein with carboxylate-binding activity. **Journal of Experimental Botany**, v. 56 (419), p. 2335-2344, 2005.

DROBY, S., PORAT, R., COHEN, L., WEISS, B., SHAPIRO, B., PHILOSOPH-HADAS, S., MEIR, S. Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest

jasmonate application. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124 (2), p. 184-188, 1999.

EFTINK, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. In: **Methods of Biochemical Analysis: Protein Structure Determination**. London: John Wiley & Sons. 1991, p. 128-205.

EGOROV, T. A., ODINTSOVA, T. I., PUKHALSKY, V. A., GRISHIN, E. V. Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, v. 26, p. 2064-2073, 2005.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologia de produção da soja. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/download/tpsoja_2007.pdf> Acesso em 10 jan.2007.

FAO. The state of food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Agriculture Series**. No. 38, 2006.

FAJARDO J. E., MCCOLLUM T. G., MCDONALD, R. E., MAYER, R. T. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum*. **Biological Control**, v. 13 (3), p. 143-151, 1998.

FARMER E.E, ALMERAS E., KRISNAMURTHY V., Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion Plant Biology**, v. 6, p. 372-378, 2003.

FEOFILOVA E. P., NEMTSEV D. V., TERESHINA V. M., MEMORSKAYA A. S. Developmental change of the composition and content of the chitin–glucan complex in the fungus *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42 (6), p. 545-549, 2006.

FERNANDES, C. F., VASCONCELOS, I. M., SILVEIRA, J. A. G., MORAES, V. C., OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1040-1048, 2006.

FREIRE, M. G. M., GOMES, V. M., CORSINI, R. E., MACHADO, O. L. T., SIMONE, S. G., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S., MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, v. 156, p. 145-169, 2002.

GIFONI, J. M. **Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu papel na defesa da planta**. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2005.

GIUDICI, A. N., REGENTE, M. C., VILLALIAN, J., PFÜLLER K., PFÜLLER U., CANAL, L. Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi. **Physiologia Plantarum**, v. 121, p. 2-7, 2004.

GOMES, A. P. G., DIAS, S. C., BLOCH Jr., C., MELO, F. R., FURTADO Jr., J. R., MONNERAT, R. G., GROSSI-DE-SÁ, M. F., FRANCO, L. O. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 313-319, 2005a.

GOMES, C. E. M., BARBOSA, A. E. A. D., MACEDO, L. L. P., PITANGA, J. C. M., MOURA, F. T., OLIVEIRA, A. S., MOURA, R. M., QUEIROZ, A. F. S., MACEDO, F. P., ANDRADE, L. B. S., VIDAL, M. S., SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and

Ceratitis capitata (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1095-1102, 2005b.

HADJDUCH M., GANAPATHY A., STEIN J. W., THELEN J. J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiology**, v. 137(4): p. 1397-1419, 2005.

HARBOE, N., INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In: **A Manual Quantitative Immunoelectrophoresis**. AXELSEN, N. H. (ed.). Blackwell Scientific Publications, London, p. 161-164, 1973.

HAROLD, F. M., CALDWELL, J. H. Tips and currents: electrobiology of apical growth. In: **Tip Growth in Plant and Fungal Cells**, Heath, I. B. (ed.) Academic Press, San Diego, CA. 1990, p. 59-90.

HEIL, M., BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, v. 89, p. 503-512, 2002.

HERMAN E. M., HELM R. M., JUNG R., KINNEY A. J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. **Plant Physiology**, v. 132 (1), p. 36-43, 2003.

HO, V. S. M., WONG, J. K., NG, T. B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides**, v. 28, p. 760-766, 2007.

HOLTORF, S., LUDWIG-MÜLLER, J., APEL, K., BOHLMANN, H. High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Molecular Biology**, v. 36 (5), p. 673-680, 1998.

HOPE, M. J., BALLY, M. B., WEBB, G., AND CULLIS, P. R. Production of large unilamellar vesicles by an extrusion procedure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 812, p.55-65, 1985.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa02200705.shtm>> Acesso em 10 jan.2007.

JANISICWICZ, W. J, KORSTEN L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 411-41, 2002.

JI, C., KÚC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.

JWA N. S., AGRAWAL, G. K., TAMOGAMI S., YONEKURA, M., HAN, O., IWAHASHI, RAKWAL, H. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44 (5-6), p. 261-273, 2006

KAMINSKYJ, S. G. W., GARRILL, A., HEATH, I. B. The relation between turgor and tip growth in *Saprolegnia ferax*: turgor is necessary, but not sufficient to explain apical extension rates. **Experimental Mycology**, v.16 (1), p. 64-75, 1992.
KATO, T., SHIRANO, Y., IWAMOTO, H., SHIBATA, D. Soybean lipoxigenase L-4, a component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissue: expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. **Plant and Cell Physiology**, v. 34 (7), p. 1063-1072, 1993.

KODA, Y., KIKUTA, Y., KITAHARA, T., NISHI, T., MORI, K. Comparisons of various biological activities of stereoisomers of methyl jasmonate. **Phytochemistry**, v. 31 (4), p. 1111-1114, 1992.

KUMARI, G. J., REDDY, A. M., NAIK, S. T., KUMAR, S. G., PRASANTHI, J., SRIRANGANAYAKULU, G. , REDDY, P.C., SUDHAKAR C. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 50 (2), p. 219-226, 2006.

KUNKEL, B. N., BROOKS D. M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opininn in Plant Biology**, v. 5, p. 325-332, 2002.

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

LAMB, C., DIXON R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.

LEAB R, TOMMERUP H, SVENDSEN I, MUNDY J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 1564-1573, 1991.

LEE, S. P., HWANG, Y. S., KIM, Y.J., KWON, K., KIM, H. J., KIM, K., CHAE, H. Z. Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. **Journal of Biology Chemistry**, v. 276, p. 29826-29832, 2001.

LEE, J. R., PARK, S-C., KIM J-Y., LEE, S. S., PARK Y., CHEONG, G-W., HAHM, K-S., LEE, S. Y. Molecular and functional characterization of a cyclophilin with antifungal activity from Chinese cabbage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 672-678, 2007.

LELKES, P.I. Liposome technology 3: Targeted drug delivery and biological interation. **Gregoriadis**, v.3, p. 225-246, 1984.

LIENER, I. E. The intraperitoneal toxicity of concentrates of the soybean trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 183-188, 1951.

LIENER, I. E., PALLANSCH, M. J. Purification of a toxic substance from defatted soybean flour. **Journal of Biological Chemistry**, v. 197, p. 29-36, 1952.

LIPKA, V., PANSTRUGA, R. Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 625-631, 2005.

MACDONALD, R. C., MACDONALD, R. I., MENCO, B. P., TAKESHITA, K., SUBBARAO, N. K., L.R, H. U. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, p. 297-303, 1991.

MAIA, F. C., DE MORAIS, D. M., MORAES, R. C. P. Atividade total da fosfatase ácida e da α -amilase induzidas por ácido jasmônico em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22 (1), p. 259-263, 2000.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 1-10, 1999.

MELO, V. M. M., VASCONCELOS, I. M., GOMES, V. M., CUNHA, M., SOARES, A. A., OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, v. 169, p. 629-639, 2005.

MENEZES, H., JARED, C. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 1-7, 2002.

MEWIS, I., APPEL, H. M., HOM, A., RAINA, R., SCHULTZ, J. C. Major signaling pathways modulate arabidopsis glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. **Plant Physiology**, v. 138, p.1149-1162, 2005.

MINCOFF, P. C., GARCIA, C. D., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Isolation and characterization of a 30 kD antifungal protein from seeds of Sorghum bicolor. **Research in Microbiology**, v. 157 (4), p. 326-32, 2006.

MONK, B. C., PERLIN, D. S. Fungal plasma-membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20 (3), p. 209-223, 1994.

MOONEY, B. P., KRISHNAN, H. B., THELEN, J. J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. **Phytochemistry**, v. 65 (12), p. 1733-1744, 2004.

NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**. v. 198, p. 249-266, 2004.

NG, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, v. 25 (7), p. 1215-1222, 2004.

NG, T. B., PARKASH, A. Hispin, a novel ribosome inactivating protein with antifungal activity from hairy melon seeds. **Protein Expression and Purification**, v. 26 (2), p. 211-217, 2002.

NGAI, P. H. K., NG, T. B. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74 (2), 366-371, 2007.

NOBEL, J. G., DIJKERS, C., HOOIJBERG, E., KLIS, F. M. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 135, p. 2077-2089, 1989.

NURNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences **Immunological Reviews**. v. 198, P. 249-266, 2004.

PALLANSCH, M. J., LIENER, I. E. Soyin, a toxic protein from the soybean: II. Physical characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 45 (2), p. 366-374, 1953.

PELEGRINI, P. B., NORONHA, E. F., MUNIZ, M. A. R., VASCONCELOS, I. M., CHIARELLO, M. D., OLIVEIRA, J. T. A., FRANCO, O. L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S-albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1764 (6), p. 1141-1146, 2006.

PLIYEV, B. K., GURVITS, B. Y. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases: structure and functions. **Biochemistry**, v. 64, p. 738-751.

RAKWALL, R., KOMATSU, S. Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2492-2500, 2000.

RAKWALL, R. AGRAWAL, G. K., YONEKURA, M. Separation of proteins from stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissues by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis: induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins

by jasmonic acid, UV-irradiation and copper chloride. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3472-3478, 1999.

RAST D. M., BAUMGARTNER D., MAYER C., HOLLENSTEIN G.O. Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**, v. 64, p. 339-366, 2003.

REDDY, M. V. B., BELKACEMI, K., CORCUFF R., CASTAIGNE, F., ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 20, (1), p.39-51, 2000.

REINBOTHE, S., MOLLENHAUER, B., REINBOTHE, C. JIPs and RIPs: The Regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1197-1209, 1994.

REPKA, V., FISCHEROVÁ, I., ŠILHÁROVÁ, K. Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. **Biologia plantarum**, v. 48 (2), p. 273-283, 2004.

RÖSE, U. S., TUMLINSON, J. H. Systemic induction of volatile release in cotton: how specific is the signal to herbivory? **Planta**, v. 222 (2), p. 327-335, 2005.

ROWHANI, A., FALK, B. W. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Methods to certify pathogen (Virus)-free plants. In: GAMBORG. O. L., PHILLIPS, G. C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1995, p. 266-280.

SAMBETH, W., NESHEIM, M. C., SERAFIN, J. A. Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. **Journal of Nutrition**, v. 92 (4), p. 479, 1967.

SANDVIG, K., GRIMMER, S., LAUVRAK, S. U., TORGERSEN, M. L., SKRETTING, DEURS B., IVERSEN, T.G. Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 117, p. 131-141, 2002.

SCHILMILLER, A. L., HOWE, G. A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinon in Plant Biololy**, v. 8 (4), p. 369-377, 2005.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SEMBDNER, G., GROSS, D. Plant growth substances of plant and microbial origin. In: Bopp, M. (ed) **Plant Growth Substances**. Springer-Verlag, Berlin, 1986. p. 139-147.

SEMBDNER, G., PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates . **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44 (1), p. 569-589, 1993.

SERRANO, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 61-94, 1989.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 55-70, 1999.

SIEBRA, E. A. **Toxina da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: aspectos bioquímicos e seu provável papel na defesa da planta**. 2004. 148f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

SPOEL, S. H., KOORNNEEF, A., CLAESSENS, S. M. C. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. **The Plant Cell**, v. 15, p. 760-770, 2003.

SREERAMA, N., WOODY, R.W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular-dichroism. **Biophysical Journal**, v. 64 (2), p. 32-44, 1993.

STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C. T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M., CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45 (6) p. 753-760, 2005.

STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., PRASAD, V., WIEDEMANNMERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75 (8), p. 687-706, 1993.

TAIRA, T., TOMA, N., ISIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 45, p. 609-618, 2005.

TERRAS, F. R. G, EGGERMONT, K., KOVALEVA, V., RAIKHEL, N. V., OSBORN R. W, KESTER A, REES, S. B., TORREKENS S, VAN LEUVEN, F., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B. P. A., BROEKAERT, W. F. Small cystein-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defence. **Plant Cell**, v. 7, p. 573-588, 1995.

TERRY, L. A., JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32 (1), p. 1-13, 2004.

THEIS, T., WEDDE, M., MEYER, V., STAHL, U. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47 (2), p. 588–593, 2003.

THEVISSSEN, K., TERRAS, F. R. G., BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65 (12), p. 5451-5458, 1999.

THORDAL-CHRISTESEN, H. Fresh insights into processes of non-host resistance. **Current Opininn in Plant Biology**, v. 6, p. 103-110, 2003.

TOUCH V., HAYAKAWA S., SAITOH K. Relationships between conformational changes and antimicrobial activity of lysozyme upon reduction of its disulfide bonds. **Food Chemistry**, v. 84, p. 421-428, 2004.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRANBARGER, T. J., FRANCESCHI, V. R., HILDEBRAND, D. F., GRIMES, H. D. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. **Plant Cell**, v. 3, p. 973-987, 1991.

TRIPATHI, P., DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32 (3), p. 235-245, 2004.

TURRINI, A., SBRANA, C., PITTO, L., CASTIGLIONE, M. R., GIORGETTI, L., BRIGANTI, R., BRACCI, T., EVANGELISTA, M., NUTI, M. P., GIOVANNETTI, M. The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum*

melongena is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 163, p. 393-403, 2004.

UNNIKRISHNAN, V., NATH, B. S. Hazardous chemicals in foods. **Indian Journal of Dairy and Bioscience**, v. 11, p. 155-158, 2002.

VAN BREUSEGEM, F., DAT, J. F. Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiology**, v. 141, p. 384-390, 2006.

VAN DEN BERGH, K. P. B., PROOST, P., VAN DAMME, J., COOSEMANS, J., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* (L.)). **Febs Letters**, v. 530, p. 181-185, 2002.

VAN DEN BERGH, K. P. B., ROUGE P., PROST. P., COOSEMANS, J., KROUGLOVA, T., ENGELBORGH, Y., PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **Planta** v. 219, p. 221-232, 2004.

VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A. B., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F. U., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 1-8, 2001.

VASCONCELOS, I. M., TRENTIM, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, p. 357-366, 1994.

VOGELSANG, R., BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v. 189, p. 60-69, 1993.

WANG, H. X., NG, T. B. An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. Arvense. **Peptides**, v. 27 (7), p. 1732-1737, 2006a.

WANG, H. X., NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 349-353, 2006b.

WANG H. X., NG T. B., LIU, W. K., OOI, V. E. C., CHANG, S. T. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28 (5), p. 601-607, 1996.

WASTERNAK, C., PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in plant science**, v. 2 (8), 1997.

WEDEMEYER, W. J., WELKER, E., NARAYAN, M., SCHERAGA, H. A. Disulfide bonds and protein folding. **Biochemistry**, v. 39, p. 4207-4216, 2000.

WILLMANN, M. R. Plant defense in the absence of jasmonic acid. **Trends in Plant Science**, v.7 (1), p. 8-9, 2002.

YANG, X., LI, J., WANG, X., FANG, W., BIDOCHKA, M. J., SHE, R., XIAO, Y., PEI, Y. Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. **Peptides**, v. 27, p. 1726-1731.

YAO , H. J., TIAN, S.P. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98 (4), p. 941-950, 2005.

YE, X. Y., NG, T. B. Mungin, a novel cyclophilin-like antifungal protein from the mung bean. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, p. 1111-1115, 2000.

YE, X. Y., NG, T. B. Isolation of unguilin, a cyclophilin-like protein with anti-mitogenic, antiviral, and antifungal activities, from black-eyed pea. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20 (5), p. 353-359, 2001.

YIORINORI, J. T., HIROMOTO, D. M. Controle integrado de doenças de soja: determinação de perdas de vigor em soja causadas por doenças fúngicas. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Resultados de Pesquisa da Empresa Soja 1997**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, p. 112-114, 1998.

XIA, L., NG, T. B. An antifungal protein from flageolet beans. **Peptides**, v. 26 (12), p. 2397-2403, 2005.

ZAINURI, D. C., JOYCE, D. C., WEARING, A. H., COATES, L., TERRY, L. Effects of phosphonate and salicylic acid treatments on anthracnose disease development and ripening of 'Kensington Pride' mango fruit." **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41 (6), p. 805-813, 2001.

ZHAO, J., DAVIS, L. C., VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23 (4), p. 283-333, 2005.

