



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

HERMÓGENES DAVID DE OLIVEIRA

**TOXINAS PROTÉICAS DE SEMENTES DE SOJA
[*Glycine max* (L.) Merr.]: ASPECTOS
MOLECULARES E FUNCIONAIS**

FORTALEZA – CEARÁ

2009

HERMÓGENES DAVID DE OLIVEIRA

TOXINAS PROTÉICAS DE SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.]:
ASPECTOS MOLECULARES E FUNCIONAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Co-Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sa

HERMÓGENES DAVID DE OLIVEIRA

TOXINAS PROTÉICAS DE SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.]:
ASPECTOS MOLECULARES E FUNCIONAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Tese aprovada em: 08 de junho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará
(Orientadora)

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

Prof. Dr. José Hélio Costa
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. M. Fátima Grossi de Sa
EMBRAPA – CENARGEN (DF)

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina O. M. Moreira
Universidade de Fortaleza

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Catálogo e publicação na Biblioteca Setorial de Ciências e Tecnologia, Campus
do Pici, Universidade Federal do Ceará.

O47t Oliveira, Hermógenes David de
Toxinas protéicas de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]:
Aspectos Moleculares e Funcionais / Hermógenes David de Oliveira, 2009.
204 f.; il. color. enc.

Orientadora: Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Co-orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá
Área de concentração: Bioquímica e Química de Macromoléculas
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2009.

1. *Glycine max* 2. SYTX-2. 3. SBTX. 4. Defesa Vegetal. 5. *M.
incognita*. 6. Fungos fitopatogênicos. I. Vasconcelos, Ilka Maria (orienta.)
II. Sá, Maria Fátima Grossi de (co-orienta.) III. Universidade Federal
do Ceará – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. IV. Título.

CDD 574.192

*À minha esposa, meu amor, Magnely Moura,
companheira de todas as horas e de toda
uma vida acadêmica, por todo o empenho e
amor incondicional
Como prova de meu amor recíproco e
inesgotável*

DEDICO

*À minha mãe, Lourdes, o maior amor da minha
vida, por ser um exemplo de luta, por ter feito
de minha educação uma prioridade
Como prova do meu amor e gratidão sem
medidas*

OFEREÇO

*“Se diante de mim não se abrir o mar,
Deus vai me fazer andar por sobre as
águas.”*

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado de presente o dom da vida e por ter me mantido fiel aos seus ensinamentos ao longo de minha jornada acadêmica.

À minha mãe, **Maria Lourdes**, pelo seu amor sempre abundante e por ter feito de minha educação uma prioridade em detrimento de todas as dificuldades pelas quais passamos.

Ao meu padrasto, **João David**, por ter me trazido para Fortaleza, permitindo que eu pudesse ter acesso a uma educação de melhor qualidade, fato essencial para todas as conquistas festejadas.

À minha irmã, **Bárbara Luíza**, por simplesmente existir sendo sempre um motivo de alegria em minha vida.

Ao meu amor, minha companheira fiel e incansável, **Magnely Moura**, por existir em minha vida desde a graduação em Ciências Biológicas (1998 - UECe), pelo incentivo sempre constante e por ser um motivo para que eu acorde sempre com algo para agradecer.

À minha sogra, **Eulina Moura**, por todas as palavras de carinho, apoio e força transmitidas ao longo de toda a minha jornada científica.

Aos amigos do peito, **Michelle Costa, Daniel Mitchell, Carolina Mitchell, Isaac, Kalina Kelma, Sílvia Maria, Janne Keila, Daniele Oliveira, Fernanda Rocha, Mirizana Alves e Crystianne Calado** pelo privilégio da convivência, pelos momentos de alegria sempre abundantes e por dividirem suas vidas comigo, sem compromisso.

À minha orientadora, **Ilka Maria Vasconcelos**, por quem tenho uma grande admiração, pela preocupação sempre constante em garantir uma formação de qualidade aos seus estudantes e também pelos muitos aniversários e conquistas contempladas em sua presença.

À **Dra. Maria Fátima Grossi de Sa** pelo privilégio na co-orientação e por ter aberto as portas do Laboratório de Interação Molecular Planta Praga I (LIMMP -

Brasília), onde pude fazer amigos e desenvolver os principais experimentos desta tese.

Ao grande amigo **Osmundo Brilhante**, pela insaciável vontade em contribuir para o andamento desse trabalho e pelo bom humor abundante e passado sempre nas horas mais oportunas.

Ao **Dr. José Hélio Costa (UFC)**, por todo o auxílio nas análises através de Bioinformática.

À **Dra. Leila Beltramini (USP)** e toda a sua equipe de estudantes, pelas análises espectroscópicas realizadas

Aos colegas e irmãos científicos do Labtox: **Adelina Braga, Geórgia Sampaio, Juliana Gifoni, Helen Paula, Henrique Pinho, Anderson, Daniel e Andrea Bessa**, com quem dividi muito mais do que experimentos, de quem ouvi muito mais do que incentivos e para os quais deixo um abraço do tamanho do universo.

Às minhas verdadeiras companheiras científicas, **Mirella Leite** (primeira aluna de I.C.) e **Raquel Oliveira** (segunda estudante orientada), para quem devo 99,99% do trabalho realizado nesta tese, por serem fontes de orgulho para mim, por terem me estimulado a estudar para prepará-las e, por fim, por serem meus referenciais de um trabalho acadêmico honesto, inteligente e brilhante.

Aos grandes amigos e parceiros do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa representados aqui pela **Darcy e Hélio**, pela colaboração sempre constante, apoio sem compromisso e pela amizade conquistada.

Aos **amigos do DBBM**, parceiros de lutas experimentais incansáveis: **Cléverson, Edvar, Igor, Marina, Tuana, Tiago, Fábio e Fabiano**, pela grande colaboração prestada.

Ao **Laboratório da Profª. Norma Benevides**, por serem “vizinhos” sempre dispostos a colaborar para o andamento de nossos experimentos.

Aos amigos do LIMPP, representados aqui pela **Luciane, Raquel, Isabela, Rafael, Paulo Henrique, Lecir, Sineide, Uriele, Vivian, Thales e Aulus**, pela grande

receptividade e acolhida, pelas discussões científicas sempre produtivas e pelos momentos de descontração vividos.

À minha família de Brasília composta pelos queridos **Edilson e Alessandra, Caroline e Leo, Roberta e Dijair, Vanessa e Ismail, Ludovico, Renata e Ariane** por terem sido fiéis companheiros e parceiros nessa minha jornada, por terem feito de suas casas a minha casa e por todas as orientações prestadas nos experimentos.

Aos amigos, grandes colegas e incentivadores **Ediara, Isabele, Valdeleda, Vilena, Marússia, Júlia e Saulo**, pelo apoio, torcida e ajuda prestada ao longo da execução deste trabalho.

À minha eterna mãe científica, **Andrelina Noronha**, por simplesmente existir e ter me preparado tão bem para meu doutorado.

Aos professores do DBBM (UFC), especialmente representados pelos professores **José Tadeu e Francisco Campos**, pelos ensinamentos transmitidos e pelas amizades conquistadas.

Ao **Dr. José Tadashi Yorinori** pelo apoio experimental no fornecimento dos fungos fitopatogênicos da soja.

Aos meus **primos - Darlan, Romênia, David, Adélia, Denise, Marta, Rodrigo; tios - Raimundo, Cleide (in memorian), Toinha e Geraldo - e demais familiares** pelos incentivos constantes e por sempre estarem presentes em momentos importantes de minha vida.

À minha avó **Mundinha Sátiro** e também às suas filhas **Regina, Maria Luíza e Naninha** por simplesmente iluminarem meus caminhos com todo o seu amor.

Aos grandes irmãos do ECC - Santa Luzia, principalmente: **Daniele e Demétrius, Caetano e Viviane**, pela fé compartilhada e pela amizade sincera em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta tese foram realizados com o apoio das seguintes instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais- LABTOX**, sob coordenação e orientação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) – através de concessão de bolsa de doutorado e fomento mediado pela aprovação de projeto de pesquisa: Edital MCT/CNPq 15/2007 – Universal (Processo 477393/2007-1).

EMBRAPA – CENARGEN (DF – Brasília) – através de parceria experimental com o Laboratório de Interação Molecular Planta - Praga, sob coordenação e orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

FACULDADE CHRISTUS – através da concessão de auxílio editorial e do apoio ao autor da tese, em todas as fases de seu trabalho.

DEMAIS INSTITUIÇÕES DE FOMENTO E APOIO À PESQUISA COMO: CAPES, FUNCAP e FCPC (UFC) que contribuem para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

RESUMO

OLIVEIRA, H.D. **Toxinas Protéicas de Sementes de Soja [*Glycine max* (L.) Merr.]: Aspectos Moleculares e Funcionais.** 2009. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

A soja (*Glycine max*) é uma espécie de grande valor econômico para o Brasil dada a multiplicidade de uso de seus grãos na alimentação animal e na indústria. Embora o Brasil seja o segundo maior produtor mundial dos grãos, as perdas na produtividade em campo ainda são consideráveis, principalmente àquelas causadas por nematóides do gênero *Meloidogyne* e por fungos fitopatogênicos. Mesmo com a existência de alternativas químicas para o controle dessas espécies, bem como com a existência de genótipos resistentes, as perdas agrícolas ainda são consideráveis, mostrando que a busca por mecanismos naturais de resistência ambientalmente seguros são práticas necessárias para o controle de pragas e patógenos e para a melhoria na produtividade. Este trabalho objetivou caracterizar bioquímica e funcionalmente duas toxinas protéicas isoladas de sementes de soja, bem como avaliar os seus papéis na defesa contra patógenos de importância agrônômica para essa espécie. Foi mostrado experimentalmente que SYTX-2 (28 kDa) é uma proteína ácida encontrada em duas isoformas (27,3 e 27,2 kDa) de pI's 5,11 e 5,24, as quais apresentam a mesma extremidade NH₂-Terminal (KTISSSEDPFFNCREK). A análise por difracto circular mostrou que a SYTX-2 apresenta um espectro típico de proteínas que apresentam α -hélice e folhas- β , sendo essa estrutura semelhante àquela já descrita para a SBTX. Esses padrões são gradualmente perdidos quando a proteína é aquecida de 25 a 95 °C. Os espectros de emissão em 280 e 295 nm (323 e 313 nm, máximo) mostraram padrões típicos de resíduos de triptofano presentes no interior da estrutura terciária. SYTX-2 é uma hemilectina capaz de aglutinar indiretamente eritrócitos de coelho em presença de anticorpos policlonais anti-SYTX-2, sendo essa atividade inibida por D-manose. Além disso, *in vitro*, SYTX-2 apresentou atividade ribonucleásica, cuja atividade específica (1821,42 \pm 3,34 UA. h⁻¹ mgP) foi semelhante àquela descrita para a ribonuclease de raízes de *V. unguiculata*. Foi observado que SYTX-2 está presente na casca das sementes em teores menores do que os observados para os cotilédones, além de se distribuir também em raízes, caules e folhas. As raízes jovens apresentam os maiores teores de SYTX-2 (62,62 \pm 10,10 μ g de SYTX-2/g de tecido) sendo essa expressão triplicada em tecidos adultos (195,12 \pm 35,54 μ g/g de tecido). Em pH 5,0 essa proteína é exsudada das sementes ao longo de 24 h, sendo o pico de exsudação mostrado 18 h após o contato com o tampão (6,16 \pm 0,08 μ gP de SYTX-2/semente). Tal como descrito para muitas proteínas de defesa, SYTX-2 foi induzida 6 h após a injúria mecânica de folhas (de 6,7 para 10,46 μ g de SYTX-2/ g de tecido), retornando aos valores normais 24 h após a lesão. *In vitro* SYTX-2 apresentou uma potente atividade nematicida contra *M. incognita* Raça 4, induzindo a mortalidade de 85% dos J2 6h após incubação com a proteína, e de 100% após 24 h. Essa toxina também foi capaz de inibir (20%) o crescimento de *C. albicans*, embora não tenha sido efetiva em inibir a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos (*R. solani*, *Phomopsis* sp. e *F. solani* f.sp. *glycines*). Este trabalho também descreve o isolamento, a clonagem e a caracterização do cDNA da subunidade de 27 kDa da SBTX (44 kDa). O cDNA foi isolado a partir de um *pool* de RNA extraído de sementes 15, 25 e 35 dias após a antese, utilizando iniciadores desenhados a partir do NH₂-terminal das duas subunidades da proteína (27 e 17 kDa). Evidências experimentais sugerem fortemente que as duas subunidades da proteína são codificadas por genes diferentes. A subunidade de 27 kDa da SBTX apresenta um cDNA de 815 pb, composto por uma ORF de 660 nucleotídeos, codificante para uma proteína com 219 resíduos de aminoácidos. A sequência do cDNA da SBTX foi detectada em dois cromossomos (04 e 06) e a busca por EST's para essa proteína, mostrou que além de ser expressa em todo o vegetal, níveis elevados de transcritos são observados após a infecção contra *P. sojae* e *F. solani* f. sp. *glycines*, evidenciando seu importante papel na defesa contra fungos fitopatogênicos. A sequência deduzida de aminoácidos da subunidade de 27 kDa apresenta um peptídeo sinal de 26 resíduos de aminoácidos, clivado para a produção da proteína madura, que apresenta, portanto, massa molecular de 21,7 kDa e pI 9,3, sendo uma proteína básica. Na sequência de aminoácidos da subunidade de 27 kDa também foram identificados: um resíduo de cisteína, envolvido na formação de uma ponte dissulfeto com a subunidade de 17 kDa, 11

sítios de fosforilação em Ser, Thr ou Tyr, 8 sítios de glicosilação para GlcNAc e um sítio para adição de oligossacarídeos tipo mucina (GalNAc). A toxina também apresenta sítios de clivagem para pepsina, tripsina e quimiotripsina que podem justificar a ausência de toxicidade observada em camundongos após administração oral. SYTX-2 e SBTX foram mostradas através de uma caracterização estrutural ainda mais completa que as descritas por Sousa (2006) e Siebra (2004) e as informações obtidas permitiram definir que essas proteínas são parte importante da defesa da soja contra fungos fitopatogênicos e nematóides. Além de inéditos e de extrema relevância, todos esses dados darão subsídios para estudos posteriores que objetivem, para SYTX-2, determinar sua microestrutura protéica e isolamento gênico e, para SBTX, realização de projetos futuros, visando o desenvolvimento de plantas transgênicas com uma maior resistência a fungos.

Palavras-chave: *Glycine max*, SYTX-2, SBTX, defesa vegetal, *M. incognita*, fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, H.D. **Toxic Proteins from Soybean Seeds [*Glycine max* (L.) Merr.]: Molecular Aspects and Functional Analysis.** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

Soybean provides significant sources of fatty acids and proteins for human and animal nutrition and also has non-food uses. Conditions in almost all cultivated land are sub-optimal for plant growth as a result of the increasing incidence of diseases, even in developed agricultural systems. To meet these challenges, genes and proteins that control their resistance to a wide range of pathogens need to be identified and characterized to facilitate improvements in crop productivity. The main focus in this thesis has been to characterize (providing basic information about biochemical characteristics) and study the functional role of SYTX-2 (28 kDa) and SBTX (44 kDa), two toxic proteins isolated from soybean seeds, in plant defense against pathogens. The SYTX-2 was purified by a combination of ammonium sulphate fractionation and two chromatographic steps. Bidimensional electrophoresis of this protein revealed the presence of two spots (27.3 e 27.2 kDa), with isoelectric points values corresponding to 5.11 and 5.24, respectively, exhibiting the same N-terminal sequence (KTISSDSPFFNCREK). SYTX-2 has also ribonuclease activity (1821.42 ± 3.34 UA. h⁻¹ mgP), similar to that described in *Vigna unguiculata* leaves. The CD spectrum of SYTX-2 presents an alpha-beta profile spectrum, similar to the structure described to SBTX. Regarding to the temperature exposure, monitored by CD, it was observed that the structure of SYTX-2 is vulnerable to the temperatures above 40 °C. The fluorescence spectra of Soyatoxin-2 marked a maximum emission of fluorescence at 323-333 nm and confirmed that the tertiary structure of this protein was correctly folded. SYTX-2 behaves as a hemilectin: it does not directly promote agglutination of red blood cells, but toxin-treated erythrocytes are readily agglutinated in the presence of anti-SYTX-2 antibodies. ELISA assays showed that SYTX-2 was exuded during seed imbibition, the maximum level of exuded toxin (6.16 ± 0.08 µg/seed) detected being at 18 h after the start of imbibition. The expression profiles of SYTX-2 in various soybean tissues were investigated with ELISA assay or Dot Blot analysis. The expression analysis suggested that SYTX-2 was clearly detected in seed coat, leaves, roots and also in stems. However, expression of SYTX-2 in roots is higher than that in leaves and stems. A strong induction of SYTX-2 expression was also observed in wounded leaves 6 h after treatment and it decreased thereafter. *In vitro*, antifungal activity of SYTX-2 was not detected against *R. solani*, *Phomopsis* sp. and *F. solani* f.sp *glycines*, but this protein inhibits *C. albicans* growth. Nematicidal effects of SYTX-2 were studied *in vitro* against *Meloidogyne incognita* nematode and the toxin (11µg/nematode) showed a high nematicidal activity, with the mortality of 85%, after six hours contact and of 100%, after 24 h of incubation. This work also describes the isolation, sequencing and functional analysis of cDNA (815 pb) encoding 27 kDa subunit of soybean toxin (SBTX). CDNA was amplified using a forward primer designed based on the N-terminal sequence of the toxin in combination of primer AP. The genomic location of the 27 kDa SBTX subunit SBTX was preliminarily determined with the mapped soybean ESTs database (www.phytozome.net) at Gm04 and Gm06 chromosome of soybean and thus may have two copies per genome. The deduced protein sequence of 219 amino acids (MW of mature protein 21.7 kDa, pI 9.3) included an N-terminal signal peptide. EST's encoding 27 kDa subunit SBTX were present in cotyledons, leaves, and seedlings and the expression of 27 kDa subunit SBTX was also induced in tissues by *P. sojae* and *F. solani* f. sp. *glycines* infection and by abiotic stress. In addition to these blocks, the 27 kDa deduced protein sequence contains a putative Ser/Tyr/Thr phosphorylation and also contains eight potential N-linked glycosylation sites and a threonine/serine-rich region which is a potential site for attachment of O-linked carbohydrate. Potential sites for pepsin, trypsin and chymotrypsin hydrolysis were also detected. The results add a new dimension to toxins SBTX and SYTX functionalities and support the concept that these proteins act protecting soybean against pathogens.

Keywords: *Glycine max*, SYTX-2, SBTX, plant defense, *M. incognita* and phytopathogenic fungi

LISTA DE ABREVIATURAS

1 kb Plus	Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases
2-DE	Eletroforese Bidimensional
AP	<i>Anchor Primer</i>
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	<i>Circular Dichroism</i>
cDNA	DNA Complementar
CNTX	Canatoxina
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
cv.	Cultivar
D. O.	Densidade óptica
DEAE	Dietilaminoetil
dNTP	Desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTC, dTTP)
DTT	Ditiotreitol
e.v.	Endovenosa
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> – Etiquetas de Seqüência Transcritas
GlcNAc	<i>N</i> -Acetil- D-glucosamina
i.p.	Intraperitoneal
IPG	Immobilized pH gradient – gradientes de pH imobilizados
IPTG	Isopropil-tio- β -galactosídeo
BCIP/NBT	5-bromo4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – janela de leitura aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pl	Ponto Isoelétrico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PR - Proteínas	Proteínas Relacionadas à Patogênese

PVDF	difluoreto polivinilideno
RIPs	Proteínas inibidoras ou inativadoras de ribossomos
SBTI	Inibidores de tripsina de soja
SBTX	Toxina da soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SYTX	Soyatoxina
SYTX-2	Soyatoxina-2
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N, N'. N' –tetrametiletilenodiamino
Tpb	Tera pares de bases
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tween	Monoleato de Polioxietilenosorbitan
UH	Unidades de Hemaglutinação
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Página
FIGURA 01.	Estádios do desenvolvimento da soja (Fehr e Caviness, 1977).....	02
FIGURA 02.	Distribuição funcional das proteínas presentes em sementes de soja a partir de mapas bidimensionais feitos por Hajduch <i>et al.</i> , 2005.....	12
CAPÍTULO II		Página
FIGURA 01.	Esquema geral de purificação da SYTX-2 descrito por Vasconcelos (1994) e modificado por Sousa (2006).....	34
FIGURA 02.	Esquema geral de produção e utilização dos anticorpos policlonais anti-SYTX-2 nos experimentos de imunodeteção em plantas de soja.....	42
FIGURA 03.	Etapas do protocolo experimental de ELISA, usadas para detecção e quantificação de SYTX-2.....	45
FIGURA 04.	Plantas de soja (cultivar BRS - Pala) em casa de vegetação (Cenargen - Embrapa).....	47
FIGURA 05.	Imagens das plantas de soja utilizadas no experimento de indução por injúria mecânica.....	50
FIGURA 06.	Perfil cromatográfico obtido após aplicação de gradiente salino (NaCl) em matriz de DEAE-Celulose.....	56
FIGURA 07.	Perfil cromatográfico obtido em coluna de Anidrotripsina-Sepharose®-4B.....	57
FIGURA 08.	Eletroforese bidimensional da SYTX-2.....	60

FIGURA 09.	Estudos da estabilidade térmica da SYTX-2 monitorada por dicroísmo circular.....	62
FIGURA 10.	Temperatura média de desnaturação da SYTX-2 em pH 7,5.....	64
FIGURA 11.	Espectro de dicroísmo circular da SYTX-2 (0,5 mg/mL) em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5, mostrando a toxina nativa (em azul - 25 °C), desnaturada (vermelho - 95 °C) e reenovelada (verde) após incubação a 25 °C por 30 min.....	65
FIGURA 12.	Espectro de fluorescência da SYTX-2.....	67
FIGURA 13.	Ensaio de atividade hemaglutinante direta e indireta da SYTX-2 utilizando eritrócitos de coelho (2%).....	69
FIGURA 14.	Determinação do título e especificidade dos anticorpos policlonais produzidos contra SYTX-2 em coelhos.....	71
FIGURA 15.	Em “A” eletroforese em gel de poliacrilamida (15%; SDS-PAGE) das proteínas extraídas da casca de sementes de soja. Em “B” <i>Dot Blotting</i> das proteínas da casca.....	74
FIGURA 16.	Proteínas exsudadas de sementes de soja ao longo de vinte e quatro horas.....	76
FIGURA 17.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) das proteínas exsudadas de sementes de soja.....	77
FIGURA 18.	Níveis de SYTX-2 exsudados a partir de sementes de soja ao longo de vinte e quatro horas.....	78
FIGURA 19.	Mapa protéico bidimensional das proteínas exsudadas por sementes de soja.....	80
FIGURA 20.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos protéicos obtidos de raízes, caules e folhas de plantas	

	jovens de soja (estádio V4) mantidas em casa de vegetação.....	83
FIGURA 21.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos protéicos obtidos de raízes, caules e folhas de plantas adultas de soja (estádio R5).....	84
FIGURA 22.	Níveis de SYTX-2 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína extraída) detectados em raízes, caules e folhas jovens de soja (estádio V4).....	86
FIGURA 23.	Níveis de SYTX-2 detectados em tecidos jovens de soja considerando a massa de tecido usada no processo de extração de proteínas.....	87
FIGURA 24.	Níveis de SYTX-2 órgãos vegetativos adultos (estádio R5) de soja	88
FIGURA 25.	Níveis de SYTX-2 detectados em tecidos adultos de soja considerando a massa de tecido usada no processo de extração de proteínas.....	89
FIGURA 26.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos totais de folhas de soja (R5) submetidas ou não à injúria mecânica.....	92
FIGURA 27.	Aumento nos níveis teciduais de SYTX-2 através de indução por injúria mecânica.....	93
FIGURA 28.	Indução da expressão de SYTX-2 em folhas adultas de soja após injúria mecânica.....	94
FIGURA 29.	Imagens de microscopia óptica mostrando a germinação de esporos de <i>Fusarium solani f.sp. glycines</i> na presença e ausência de SYTX-2	96
FIGURA 30.	Efeito da SYTX-2 sobre o crescimento do fungo leveduriforme <i>Candida albicans</i>	97

FIGURA 31. Atividade nematicida da SYTX-2 contra formas juvenis (J2) de <i>M. incognita</i>	99
FIGURA 32. Alterações morfológicas detectadas em formas juvenis (J2) de <i>M. incognita</i> após incubação por 6 h com SYTX-2.....	100

CAPITULO III		Página
FIGURA 01. Imagens da casa de vegetação (A) do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (Cenargen - Brasília), onde foi realizado o plantio de soja.....		117
FIGURA 02. Vagens e sementes de soja nos tempos de 15, 25 e 35 dias(da esquerda para a direita) após a antese (cv BRS-Pala).....		119
FIGURA 03. Mapa circular do vetor de clonagem pGEM-TEasy, com destaque para os diferentes sítios de restrição para endonucleases, gene de resistência à ampicilina e gene <i>lac Z</i> que codifica a enzima β – galatosidase.....		123
FIGURA 04. Eletroforese em gel de agarose 1% do RNA extraído de sementes de soja em diferentes estágios de maturação.....		127
FIGURA 05. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos após amplificação com os primers SBTX 27F1 e AP em diferentes temperaturas de anelamento.....		129
FIGURA 06. Análise de restrição dos plasmídeos provenientes de colônias brancas transformadas com os insertos de ~ 1400 pb e 430 pb.....		131
FIGURA 07. Sequência de nucleotídeos de parte do cDNA de SBTX amplificado com os primers SBTX 27F1 e AP, juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida.....		133
FIGURA 08. Alinhamento usando o programa Clustal W da sequência parcial do cDNA da subunidade de 27 kDa de SBTX com a sequência de		

	RNAm disponível no NCBI para uma proteína ligante de carboxilatos de soja (SC24).....	136
FIGURA 09.	Sequência de nucleotídeos da subunidade de 27 kDa de SBTX, juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida para a proteína.....	137
FIGURA 10.	Diagrama da sequência NH ₂ -terminal da subunidade de 27 kDa de SBTX, mostrando sítios de clivagem preditos para a proteína na obtenção do peptídeo sinal.....	143
FIGURA 11.	Potenciais sítios de fosforilação em resíduos de serina (amarelo), treonina (azul) e tirosina (verde) e determinação de resíduos de aminoácidos passíveis de glicosilação preditos na sequência de aminoácidos da subunidade de 27 kDa de SBTX através do uso das ferramentas <i>NetPhos 2.0 Server</i> e <i>OGPet 1.0</i> , disponível em www.expasy.ch	145
FIGURA 12.	Sítios de clivagem da pepsina preditos para a cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX.....	147
FIGURA 13.	Sítios de clivagem da tripsina preditos para a cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX.....	148
FIGURA 14.	Sítios de clivagem da quimiotripsina preditos para a cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX	149

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I		Página
TABELA 01.	Aspectos moleculares de <i>G. max</i> : sequências nucleotídicas e estudos protéicos envolvendo plantas de soja.....	10

CAPITULO II		Página
TABELA 01.	Rendimento em massa da SYTX-2 em relação à massa das sementes de BRS-Pala utilizadas no processo de purificação.....	58
TABELA 02.	Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes na SYTX-2 determinados a partir do espectro de dicroísmo circular.....	63
TABELA 03.	Determinação da toxicidade da casca de sementes de soja, em camundongos, pela via intraperitoneal.....	73
TABELA 04.	Teor de proteínas em raízes, caules e folhas de plantas jovens e adultas de soja – cv. BRS-Pala.....	82

CAPITULO III		Página
TABELA 01.	Iniciadores utilizados para obtenção do cDNA da toxina da soja....	121
TABELA 02.	Alinhamentos encontrados para a sequência parcial do cDNA da subunidade de 27 kDa da SBTX utilizando o pacote de algoritmos de busca BLAST na base de dados do SoyBase (<i>Genetics and Molecular Biology for Soybean Researchers</i>).....	134
TABELA 03.	Alinhamentos encontrados para a sequência de cDNA da subunidade de 27 kDa da SBTX, utilizando o pacote de algoritmos BLASTn na base de dados do genoma da soja.....	138

TABELA 04.	Frequência de EST's para a subunidade de 27 kDa da SBTX detectadas no banco de dados do NCBI, distribuídas em função dos genes definidos para essa proteína.....	140
TABELA 05.	Frequência de EST detectadas para a subunidade de 27 kDa da SBTX no banco de dados do NCBI.....	141
TABELA 06.	Parâmetros físico-químicos determinados para a subunidade de 27 kDa da SBTX com base na sequência de aminoácidos deduzida.....	144

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO I		Página
1. REVISÃO DE LITERATURA		01
1.1. Soja [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.]		01
1.1.1 Aspectos biológicos e importância econômica.....		01
1.1.2 Pragas, doenças e medidas de controle.....		04
1.1.3 Aspectos moleculares: Genoma e Proteoma.....		07
1.2 Mecanismos de Defesa de Plantas Mediados por Proteínas		15
1.2.1 Proteínas Tóxicas de Origem Vegetal e seu Envolvimento nos Mecanismos de Defesa.....		17
1.2.2 Potencial Biotecnológico de Proteínas Envolvidas na Defesa Vegetal.....		22
2. HIPÓTESES		25

CAPÍTULO II		Página
1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA		27
2. OBJETIVOS		29
2.1 Gerais.....		29
2.2 Específicos.....		29
3. MATERIAIS		30
3.1 Materiais Biológicos		30
3.1.1 Sementes de Soja.....		30
3.1.2 Fungos fitopatogênicos, leveduriformes e nematóides de galha da espécie <i>Meloidogyne incognita</i>		30
3.1.3 Animais experimentais.....		31
3.2 Reagentes e soluções		31
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL		32

4.1 Extração e Purificação da Soyatoxina -2	32
4.1.1 Determinação de proteínas.....	35
4.1.2 Detecção e dosagem da atividade tóxica.....	35
4.2 Caracterização Bioquímica da SYTX-2	35
4.2.1 Sequenciamento NH ₂ – Terminal.....	35
4.2.2 Análises espectroscópicas.....	36
4.2.3 Eletroforese Bidimensional.....	37
4.2.4 Efeito da SYTX-2 sobre eritrócitos de coelho.....	38
4.2.5 Atividade Ribonucleásica.....	39
4.3 Distribuição Tecidual da SYTX-2 em Sementes, Plantas Jovens e Adultas de <i>Glycine max</i>	39
4.3.1 Produção de Anticorpos Policlonais.....	39
4.3.2 Determinação do Título e da Especificidade dos Anticorpos Produzidos.....	40
4.3.3 Detecção de SYTX-2 na Casca das Sementes de Soja.....	43
4.3.4 Exsudação de Proteínas de Sementes de <i>G. max</i>	43
4.3.5 Obtenção de Plantas Jovens e Adultas de Soja e Produção dos Extratos Protéicos de Raízes, Caules e Folhas.....	46
4.3.6 Indução da Expressão da Soyatoxina-2 em Plantas Adultas Submetidas à Injúria Mecânica.....	48
4.4. Espectro de Ação da SYTX-2 Contra Diferentes Espécies de Fungos	51
4.5. Atividade nematicida da SYTX-2 contra formas juvenis (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	52
4.5.1 Obtenção de massas de ovos de formas juvenis do segundo estágio de <i>M. incognita</i>	52
4.5.2 Ensaio de atividade nematicida.....	53
5. RESULTADOS	54
5.1 Purificação e Caracterização Físico-Química da Soyatoxina-2	54
5.2 Distribuição da SYTX-2 em Sementes de <i>Glycine max</i>	70
5.3 Detecção da SYTX-2 em exsudados de sementes de soja	75
5.4 Detecção da SYTX-2 raízes, caules e folhas de plantas jovens e adultas de soja	81

5.5 Indução da expressão de SYTX-2 através de injúria mecânica.....	90
5.6 Efeito da SYTX-2 contra diferentes espécies de fungos.....	95
5.7 Atividade nematicida da SYTX-2 contra J2 de <i>M. incognita</i> R4.....	98
6. DISCUSSÃO.....	101
7. CONCLUSÕES.....	111

CAPÍTULO III		Página
1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....		113
2. OBJETIVOS.....		115
2.1 Gerais.....		115
2.2 Específicos.....		115
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....		116
3.1 Sementes de Soja Utilizadas Para Plantio.....		116
3.2 Isolamento, clonagem e caracterização do DNA complementar (cDNA) da toxina da soja – SBTX.....		116
3.2.1 Material Vegetal: Condições de Plantio.....		116
3.2.2 Coleta de Sementes e Extração de RNA Total.....		118
3.2.3 Síntese e Clonagem de cDNA – RT-PCR.....		120
3.2.4 Ligação dos Fragmentos de DNA a Vetores de Clonagem e Transformação de Células Competentes de <i>Escherichia coli</i>		122
3.2.5 Sequenciamento de DNA e Análise das Sequências por Bioinformática.....		124
4. RESULTADOS.....		129
4.1 Isolamento e Clonagem do cDNA da Toxina da Soja.....		125
4.2 Caracterização Físico-Química e Funcional de uma das Subunidades de SBTX com Base nos Dados Obtidos por Clonagem.....		142
5. DISCUSSÃO.....		150
6. CONCLUSÕES.....		157
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....		158
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		159

Fundamentação Teórica

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Soja [*Glycine max* (L.) Merr.]

1.1.1 Aspectos Biológicos e Importância Econômica

A soja é uma planta herbácea, anual, de crescimento morfológico diversificado, idêntico ao feijão comum, diferenciando-se, além de outros caracteres, pelas hastes e vagens pubescentes e porte ereto. A espécie cultivada possui 40 cromossomos, pertencendo à família Fabaceae, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae e ordem Fabales (CAPELLARI Jr. *et al.*, 1999).

Em campo, essa espécie apresenta uma taxa de crescimento e produtividade influenciadas por diversos fatores. A disponibilidade de água é um evento importante principalmente durante as fases de germinação-emergência e floração-enchimento dos grãos. A soja é uma espécie que se adapta bem a temperaturas do ar entre 20 e 30 °C e temperaturas no solo em torno de 25 °C para uma emergência rápida e uniforme (EMBRAPA, 2009).

Anualmente, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) lança no mercado, diversas cultivares adaptadas às mais variadas condições abióticas e resistência contra pragas e doenças. A adaptação de diferentes cultivares a determinadas regiões depende, além das exigências hídricas e térmicas, de sua exigência fotoperiódica, já que a soja é considerada uma planta de dia curto (EMBRAPA, 2009).

Por ser uma espécie de grande importância econômica, a soja, apresenta desenvolvimento fenológico bem caracterizado e delimitado em etapas. Essas etapas são chamadas de estádios e contribuem para padronizar as fases do ciclo reprodutivo dessa espécie, de modo a permitir a identificação mais precisa de infecções e doenças ao longo do seu ciclo. Em nível mundial, a escala de desenvolvimento fenológico mais amplamente aceita para a soja é a de Fehr e Caviness (1977), sendo também a mais utilizada entre pesquisadores que usam a soja como modelo experimental (**Figura 01**).

Período	Estádio	Descrição
Vegetativo	VE	Cotilédones acima da superfície do solo
	VC	Cotilédones completamente abertos
	V1	Folhas unifolioladas completamente desenvolvidas ¹
	V2	Primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida
	V3	Segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida
	Vn	Ante-enésima folha trifoliolada completamente desenvolvida
Reprodutivo	R1	Início do florescimento - Uma flor aberta em qualquer nó do caule ²
	R2	Florescimento pleno - Uma flor aberta num dos 2 últimos nós ³ do caule com folha completamente desenvolvida
	R3	Início da formação da vagem - Vagem com 5 mm de comprimento num dos 4 últimos nós ³ do caule com folha completamente desenvolvida
	R4	Vagem completamente desenvolvida - Vagem com 2 cm de comprimento num dos 4 últimos nós ³ do caule com folha completamente desenvolvida
	R5	Início do enchimento do grão - Grão com 3 mm de comprimento em vagem num dos 4 últimos nós ³ do caule, com folha completamente desenvolvida
	Subdivisões do estágio R5 *	<ul style="list-style-type: none"> • R5.1 - grãos perceptíveis ao tato (o equivalente a 10% da granação); • R5.2 - 11% a 25% da granação; • R5.3 - 26% a 50% da granação; • R5.4 - 51% a 75% da granação; • R5.5 - 76% a 100% da granação.
	R6	Grão cheio ou completo - vagem contendo grãos verdes preenchendo as cavidades da vagem de um dos 4 últimos nós ³ do caule, com folha completamente desenvolvida
	R7	Início da maturação - Uma vagem normal no caule com coloração de madura
R8	Maturação plena - 95% das vagens com coloração de madura	

Obs:

¹ Uma folha é considerada completamente desenvolvida quando as bordas dos trifólios da folha seguinte (acima) não mais se tocam.

² Caule significa a haste principal da planta

³ A expressão 'últimos nós' refere-se aos últimos nós superiores.

Figura 01. Estádios do desenvolvimento da soja (Fehr e Caviness, 1977).

No Brasil, essa espécie foi introduzida por volta da década de 60, quando foi trazida dos Estados Unidos como uma lavoura alternativa aos períodos de verão, durante os quais o trigo (principal lavoura da época) não podia ser plantado. Os usos iniciais dessa leguminosa eram centrados, inicialmente, como forrageira, mas, posteriormente, as atenções foram voltadas para a utilização de seus grãos em vários setores da pecuária na forma de ração para animais, como o gado, porco e frango de corte. Atualmente, a soja possui grande valor social e econômico para o Brasil dada a sua importância na produção de derivados alimentícios de alto conteúdo protéico, além de ser exportada para outros países.

Devido ao seu valor social e econômico e, também, ao melhoramento genético, resultando em genótipos de soja mais adaptados a diversas condições e resistentes a doenças, houve um rápido crescimento da cultura da soja no Brasil nos últimos 40 anos. A produção mundial de grãos em 2008/2009 (USDA - 2009) foi estimada em torno de 220,07 milhões de toneladas, resultando em uma receita produtiva superior a 30 bilhões de dólares. O Brasil é o segundo maior produtor mundial do grão, participando com mais de 27% (safra 2008/2009 estimada em 57.600,0 mil toneladas) da produção total, valor inferior apenas ao cultivado pelos Estados Unidos (CONAB, 2008). Em adição, o Brasil também figura com o maior potencial de expansão na área cultivada, podendo multiplicar a atual produção e suprir a demanda adicional pelo produto nas próximas décadas. Para 2020 a produção projetada para o Brasil é de 105 milhões de toneladas, quando será destacadamente o maior produtor exportador do produto (AGNOL, 2008).

No contexto das grandes culturas produtoras de grãos, a soja foi a que mais cresceu em termos percentuais nos últimos 37 anos, tanto no Brasil quanto em nível mundial. De 1970 a 2007, o crescimento da produção global foi da ordem de 500% (de 44 para 220 milhões de toneladas), enquanto as produções de culturas como trigo, arroz, milho, feijão, cevada e girassol cresceram, no máximo, trinta por cento desse montante (AGNOL, 2008).

A grande produção e a ampla utilização da soja são justificadas pelo elevado teor nutricional de seus grãos, formados essencialmente por 38-40% de proteína, 30% de carboidrato e 18% de óleo (85% não-saturado). Seus benefícios nutricionais ainda incluem o fato de as sementes serem boas fontes

de fósforo, potássio, zinco, ferro, vitaminas do complexo B e da vitamina antioxidante E (BURTON, 1997).

Os investimentos realizados nos últimos dois anos têm feito com que a área ocupada pelo complexo agrícola da soja tenha aumentado para 21,3 milhões de hectares plantados, o que corresponde à maior parte da área agrícola total do país. Mesmo com os grandes investimentos destinados à seleção de genótipos adaptados, os custos relativos à produção são muitas vezes aumentados devido à necessidade de estratégias de controle para insetos-praga, nematóides, fungos fitopatogênicos e condições climáticas desfavoráveis (CONAB, 2008).

1.1.2 Insetos-praga, Doenças e Medidas de Controle

Atualmente, o Brasil dispõe de cultivares de soja com potenciais de produtividade de até 6000 kg de sementes por hectare. Além de cultivares, dispõe-se de tecnologia avançada para a produção de sementes. Entretanto, devido a uma série de fatores relacionados à planta, ao ambiente e às práticas de manejo, ainda depara-se com níveis de produtividade abaixo da média nacional que se encontra ao redor de 2600 kg/ha.

Dentre os fatores bióticos envolvidos na redução dos rendimentos obtidos nas lavouras brasileiras, a ocorrência de insetos-praga, nematóides e fungos fitopatogênicos se destaca.

A soja é uma cultura que tem sido atacada por várias pragas, que podem ocorrer durante todo o seu ciclo. Mais de 300 espécies de insetos já foram relatadas alimentando-se nas lavouras ou nos grãos armazenados. *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja), *Euschistus heros* (percevejo marron), *Piezodorus guildinii* (percevejo verde pequeno) e *Nezara viridula* (percevejo verde) são insetos-praga que se destacam na lavoura da soja, em função dos grandes danos agrícolas causados no Brasil. Em relação à lagarta da soja (principal praga de interesse agrônomo), os danos são causados principalmente às folhas. Com o objetivo de completar o seu ciclo reprodutivo, cada larva pode chegar a consumir 90 cm² de folhas, causando desfolha precoce e perdas na produtividade que podem chegar a 100% da lavoura (LEPPLA *et al.*, 1977; EMBRAPA, 2009).

O controle das principais pragas da soja deve ser feito com base nos princípios do “Manejo de Pragas” e consiste de tomadas de decisão de controle com base no nível de ataque, no número e tamanho dos insetos-praga e no estágio de desenvolvimento da soja, informações estas obtidas em inspeções regulares na lavoura com este fim (EMBRAPA, 2009).

Em adição aos danos causados por insetos, a soja também aparece como um dos principais produtos agrícolas afetados por doenças causadas por fungos, juntamente com o milho e café. Para essa espécie, até o momento, foram identificadas dezenas de doenças cujas ocorrências podem variar de esporádicas ou restritas à incidência generalizada nacionalmente. A importância econômica de cada doença varia de região para região, dependendo das condições climáticas e da cultivar utilizada (EMBRAPA, 2009).

Uma das mais importantes doenças deletérias para a soja é a mancha olho-de-rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina* Hara fungus (GRAVINA *et al.*, 2004; YORINORI, 1997 a, b). Há evidências de 25 raças do patógeno no Brasil e novas raças podem ocorrer (YORINORI e KLINGELFUSS, 2000). A incidência dessa doença é favorecida pela umidade atmosférica elevada e sua influência na diminuição da produtividade é derivada da redução da área foliar fotossintética, desfoliação prematura e danos às sementes (AKEM e DASHIEL, 1994).

Outro fungo que causa grandes danos às lavouras nacionais de soja é a espécie *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. A podridão vermelha das raízes, nome da doença causada por este fungo, tem causado grandes prejuízos às lavouras de soja desde a década de 80 e, aliada a um controle químico ineficiente, causa vasta preocupação aos agricultores nas lavouras nas quais aparece (FRONZA, 2003).

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & Syd, foi constatada pela primeira vez no Brasil em 2001, sendo motivo de grande preocupação devido à sua importância e alto potencial de danos em países Africanos, da América Central e América do Sul. Em quase todos os países tropicais e subtropicais têm sido verificada a ocorrência de ferrugem (HARTMAN *et al.*, 1997). No Brasil, na safra de 2002-2003, a doença atingiu mais intensamente o estado da Bahia, causando prejuízos de mais de R\$ 300

milhões e perdas de até 90% da produção em algumas propriedades onde a doença ocorreu com alta severidade. Na safra de 2003-2004, as perdas foram menores, mas ainda significativas, sendo da ordem de R\$ 3 milhões. No total, o custo da ferrugem asiática da soja no Brasil, desde as primeiras epidemias severas até a safra de 2007/08, foi estimado em aproximadamente US\$ 10,1 bilhões, incluindo as perdas em produção, arrecadação e o custo com o controle dessa doença (Consórcio Antiferrugem, 2008). A gravidade da ferrugem asiática também reside no fato de que o fungo pode ter hospedeiros alternativos como *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*, outras espécies economicamente importantes para o Brasil (YORINORI, 2004).

De acordo com a Embrapa (2009), a expansão da cultura da soja para áreas irrigadas tem favorecido o aparecimento de outras doenças causadas por fungos, bem como a sobrevivência de estruturas reprodutivas dessas espécies após a colheita. Esse é o caso de doenças como a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), tombamento de rizoctônia (*Rhizoctonia solani*) e cancro da haste (*Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis*).

Ao longo dos anos, várias estratégias têm sido adotadas para minimizar as doenças causadas por fungos nas lavouras. Essas estratégias são baseadas em métodos genéticos, químicos e biológicos. O uso de genótipos resistentes representa uma das principais abordagens genéticas utilizadas (GRAVINA *et al.*, 2004). No entanto, a rápida evolução dos patógenos torna inviável a obtenção de genótipos pouco susceptíveis dentro de um curto intervalo de tempo e mesmo aqueles resistentes não dispensam a aplicação de defensivos químicos durante o plantio. O controle químico, por sua vez, encontra problemas como o aparecimento de espécies de fungos resistentes ao tratamento e, também, a utilização de compostos tóxicos por outros setores da cadeia alimentar. Como tentativa de controlar biologicamente tais patógenos, sobressaem-se a prospecção de proteínas de defesa, aliada à busca e transferência de genes que confirmam resistência contra esses patógenos (IQBAL *et al.*, 2005; EMBRAPA, 2009).

Não obstante a presença de insetos e fungos, causadores de perdas agrícolas consideráveis, as lavouras de soja também estão sujeitas ao ataque de nematóides. Os endoparasitas sedentários dos gêneros *Heterodera*, *Globodera* (conhecidos como nematóides de cisto) e *Meloidogyne* (nematóides

de galha) são os fitopatógenos que, na atualidade, causam perdas anuais que chegam a U\$ 125 bilhões de dólares, somente nos Estados Unidos (CHITWOOD, 2003). Desses, a espécie *Meloidogyne incognita* é provavelmente o patógeno que causa mais danos às lavouras em escala global, principalmente devido à sua grande quantidade de hospedeiros, ampla distribuição e elevada taxa reprodutiva (TRUDGILL e BLOK, 2001).

Segundo a EMBRAPA (2009), todas as medidas de controle contra nematóides de galha devem ser tomadas antes da semeadura. Ao constatar que uma lavoura de soja está atacada, o produtor nada poderá fazer naquela safra. Todas as observações e todos os cuidados deverão estar voltados para os próximos cultivos na área. Mesmo assim, estratégias como o uso de nematicidas, rotação de culturas, biocontrole e/ou uso de espécies resistentes tem sido empregados com sucesso restringindo a multiplicação desses patógenos (BIRD e KALOSHIAN, 2003). Outra estratégia que tem se mostrado promissora nos últimos anos é baseada na inibição de enzimas digestivas dos nematóides através de plantas transgênicas codificando inibidores de proteases (LILLEY *et al.*, 1999 a,b; ATKINSON *et al.*, 2001).

Diante do exposto, dois aspectos merecem destaque: (1) mesmo com os avanços tecnológicos em relação ao plantio e colheita, bem como ao uso de cultivares resistentes, as perdas à lavoura de soja ainda são consideráveis; (2) embora o manejo de pragas e o controle químico sejam estratégias importantes no controle de pragas e patógenos, trabalhos atuais têm mostrado (FRAGOSO *et al.*, 2005; BERTHOLDO-VARGAS *et al.*, 2009; MARRA *et al.*, 2009) que a prospecção e uso de genes de defesa são estratégias promissoras no controle de pragas e patógenos.

1.1.3 Aspectos Moleculares: Genoma e Proteoma

Tal como descrito anteriormente, a soja é uma oleaginosa de grande valor comercial, servindo de fonte de ácidos graxos e proteínas importantes para a alimentação humana e animal além de outros usos não-alimentícios (THELEN e OHLROGGE, 2002). Não obstante à sua importância econômica, as condições de plantio presentes em determinadas áreas são consideradas, em sua maioria, insuficientes para o crescimento vegetal. Boyer (1982) estimou

que cerca de 70% do rendimento potencial dessa espécie é perdido como resultado de condições físico-químicas desfavoráveis.

Para superar essas limitações, genes e proteínas que controlam o desenvolvimento, tolerância a estresses abióticos e resistência a doenças e pragas precisam ser identificados e caracterizados de modo a contribuir para a melhoria na produtividade (KOMATSU, TOORCHI e YUKAWA, 2007). Para espécies-modelo como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (arroz) (NATURE, 2000 e 2005), sequências genômicas completas já estão disponíveis e estão sendo utilizadas para entender muitos dos aspectos fundamentais da biologia desses organismos. Duas espécies de leguminosas *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula* também tem sido foco de análises genômicas e funcionais (UDVARDI *et al.*, 2005; LEI *et al.*, 2005).

A soja é uma espécie que também tem sido considerada, nos últimos anos, como modelo para plantas cultivadas. Isso ocorre devido ao seu mapa genético densamente saturado (CREGAN *et al.*, 1999), sistemas de transformação genética bem desenvolvidos (CLEMENTE *et al.*, 2000; XING *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1999) e a um grande número de ferramentas genéticas e experimentais aplicadas ao estudo biológico dessa espécie, além do grande apelo econômico mundial dado em função da receita gerada a partir de suas sementes e subprodutos.

O genoma haplóide da soja contém aproximadamente $1,12 \times 10^9$ pares de bases ou 1,1-1,15 Tpb no total, um tamanho que equivale à metade do genoma do milho (*Zea mays*), embora seja 7,5 vezes maior do que o genoma de *A. thaliana* (ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991). Trata-se de um tetraplóide diploidizado que anteriormente apresentava $n=11$ cromossomos, dos quais um foi perdido ao longo da evolução formando $n=10$, $2n=20$ e, posteriormente, $n=20$ cromossomos (SINGH e HYMOWITZ, 1988). Por conta disso, estima-se que cerca de 40-60% de seu genoma seja constituído de sequências repetidas (GOLDBERG, 1978; GURLEY *et al.*, 1979).

Para entender a grande quantidade de informações presentes no genoma da soja, surgiu na década de 90 o projeto intitulado “A PUBLIC EST PROJECT FOR SOYBEAN”, cujo objetivo inicial era produzir sequências de cerca de 300.000 EST (*Expressed Sequence Tags*) de várias partes da soja, em vários estágios de desenvolvimento e depositá-las no SoyBase, o banco de

dados público para armazenamento e pesquisa de sequências genômicas de soja.

EST's são sequências curtas (200 - 800 pb), não editadas e randomicamente selecionadas a partir do sequenciamento em uma única etapa de segmentos de DNA derivados de bibliotecas de cDNA (NAGARAJ *et al.*, 2006). A vantagem inicial desse tipo de abordagem é fornecer, com um custo menor do que aquele proveniente do sequenciamento genômico, informações acerca das sequências transcritas sob determinadas condições ou estados fisiológicos, capacitando a descoberta de genes, complementos para anotações de genomas, identificação da estrutura de genes e busca por transcritos alternativos além de auxiliar a análise proteômica (JONGENEEL, 2000; DONG, KROISS e OAKLEY, 2005; RUDD, 2003).

Hoje, existem mais de 1.386.618,00 EST's depositadas nos bancos de dados do SoyBase e NCBI, as quais foram reforçadas pelo volume massivo de dados fornecidos pelo genoma da soja encerrado no ano de 2008, através de um consórcio mundial feito por instituições públicas e privadas do Brasil, China, Coréia, Japão e EUA. Muitas das informações acerca do genoma da soja podem ser encontradas e analisadas através do endereço eletrônico: <http://www.phytozome.net/soybean>.

Mesmo com o grande número de informações genômicas depositadas para a soja, os estudos das funções dessas sequências ainda estão em sua fase inicial. Além disso, muitas dessas análises se tornariam demasiadamente difíceis de analisar devido às duplicações apresentadas pelo genoma, se não fosse o auxílio de abordagens proteômicas, para análise de estrutura e função dos genes (KOMATSU e AHSAN, 2009). Não se pode duvidar, entretanto, da riqueza de informações fornecidas pelo estudo do genoma de um organismo. Para a soja, a simples existência de um banco de sequências nucleotídicas já fornece informações muito à frente das sequências de proteínas depositadas para essa espécie (**Tabela 01**) (LOCKHART e WINZELER, 2000; PANDEY e MANN, 2000).

Tabela 01. Aspectos moleculares de *G. max*: sequências nucleotídicas e estudos protéicos envolvendo plantas de soja. Abaixo, links dos bancos de dados construídos para essa espécie

REGISTROS NO NCBI	
Detalhamento	Número
◆ Projeto Genoma	1
◆ EST (sequências nucleotídicas)	1.386.618,00
◆ Domínios com Estrutura Tridimensional Definida	447
◆ Registros no UniGene	33.607
◆ Sequências Protéicas	12.652
◆ Genes	1.461
◆ Artigos Científicos – PubMed Central	3.092

LINKS	
Banco de Dados	Finalidade
◆ NCBI	Busca por sequências de nucleotídeos e aminoácidos, além de realizar o alinhamento usando algoritmos como BLASTp, BLASTn etc.
◆ SoyBase	Busca por sequências nucleotídicas, de aminoácidos e no Banco de EST de soja
◆ Soybean Proteome DataBase	Busca por informações acerca de proteínas expressas em soja sob diferentes condições e estágios ontogenéticos

A despeito de todas as informações disponíveis para o genoma da soja, estudos proteômicos com essa espécie somente começaram a ocorrer de forma considerável a partir do ano de 2002, quando novos métodos para extração e solubilização de proteínas puderam ser disponibilizados (HERMAN *et al.*, 2003). Esse evento foi importante visto que tecidos recalcitrantes como aqueles presentes em diversas partes da soja possuem compostos fenólicos, enzimas proteolíticas, oxidativas e carboidratos que dificultam a extração e análise das proteínas dessas partes (TSUGITA e KAMO, 1999; SARAVANAN e ROSE, 2004; CARPENTIER *et al.*, 2008).

A partir do surgimento de novos métodos para extração e análise de proteínas por eletroforese bidimensional, diversas partes da soja tem sido submetidas a estudos detalhados envolvendo 2-DE. Pelo fato de representarem o foco primário das atenções comerciais, sementes maduras de soja foram extensivamente analisadas por vários grupos de pesquisa através de abordagens proteômicas (MOONEY e THELEN, 2004; NATARAJAN *et al.*, 2005; NATARAJAN *et al.*, 2006).

Estudos proteômicos realizados por HAJDUCH e colaboradores (2005) mostraram que ao longo das etapas de produção de grãos de soja mais de 600 proteínas são expressas, as quais podem ser agrupadas em quinze categorias funcionais distintas (**Figura 02**). Entre essas categorias, destacam-se as proteínas relacionadas ao metabolismo celular (22%), a síntese e armazenamento de proteínas (10%), à transdução de sinais (7%) e àquelas necessárias nas etapas de crescimento e divisão celular (7%). Ainda que dentro de cada uma dessas categorias muitas moléculas tenham sido identificadas, diversas (28%) proteínas foram agrupadas como não-classificadas, por não terem função biológica predita.

Um estudo mais aprofundado feito por Agrawal e colaboradores (2008), utilizando análises por MudPIT mostraram que, das proteínas presentes nas sementes maduras, cerca de 73% delas apresentam massas moleculares entre 20 e 60 kDa, sendo a minoria (8%) representada por proteínas com menos de 20 kDa. Com relação ao ponto isoelétrico, 77% das proteínas estão distribuídas na zona de pI 4-7, não sendo comuns proteínas de pI básico ou abaixo de 4.

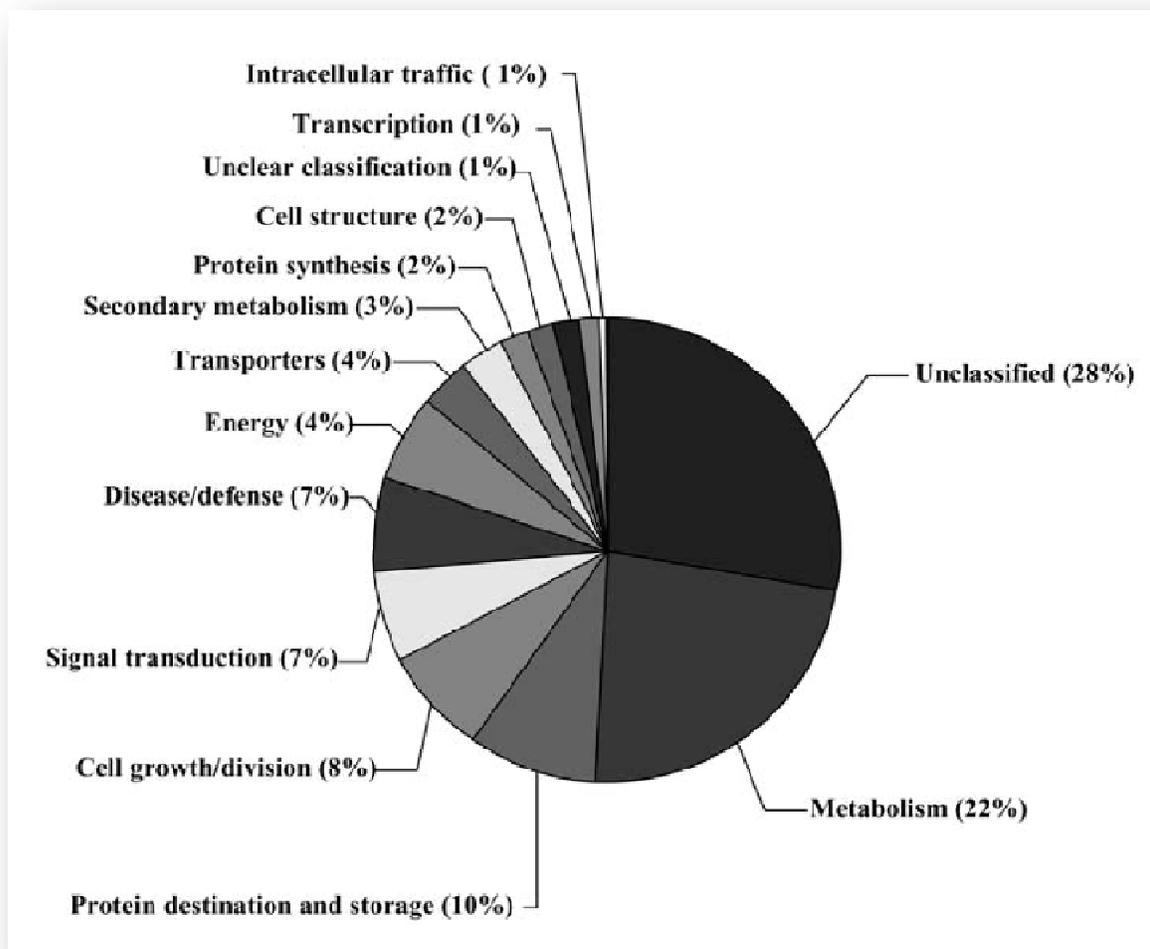


Figura 02. Distribuição funcional das proteínas presentes em sementes de soja a partir de mapas bidimensionais (Hajduch *et al.*, 2005). A distribuição foi feita a partir de genes com funções não redundantes, seguindo a nomenclatura adotada por Bevan *et al.*, 1998.

Em conjunto, esses dados mostram que as sementes de soja apresentam um vasto repertório de proteínas ainda pouco estudadas e caracterizadas bioquímica e funcionalmente.

1.1.3.1 Proteínas presentes em sementes de soja e sua atuação na defesa vegetal

As sementes de soja possuem um rico conteúdo protéico, não apenas quando se considera a quantidade de proteínas, mas também a diversidade. Em termos percentuais, as sementes possuem, em média, 30-45% de proteína em sua composição, muitas delas distribuídas de forma desigual entre a casca e os cotilédones (DHAUBHADEL *et al.*, 2005).

Estudos fisiológicos, realizados na década de 70, mostraram que a deposição de proteínas nas sementes acontece de forma gradual ao longo de oito semanas consideradas a partir da antese (HILL e BREIDENBACH, 1974). Muitas dessas proteínas têm sido investigadas, não apenas em relação à sua expressão ao longo do desenvolvimento, mas também em relação aos seus potenciais usos biotecnológicos.

A casca da soja corresponde a 4-8% da massa de sementes maduras e, a partir dessa estrutura, foram isoladas mais de 10 proteínas diferentes, as quais incluem: proteínas ricas em prolina (PERCY *et al.*, 1999), inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk (SESSA e WOLF, 2001), peroxidases – 41 kDa (GIJZEN *et al.*, 2001), uma proteína hidrofóbica – 8 kDa (GIJZEN *et al.*, 1999), quitinase da classe I - 32 kDa (GIJZEN *et al.*, 2001) e uma proteína capaz de interagir com carboxilatos - 24 kDa (DHAUBHADEL *et al.*, 2005).

Santos e colaboradores (2008) mostraram que frações provenientes da casca da soja, ricas em atividade peroxidásica, fosfatase ácidas e contendo proteínas tipo vicilina-*like* foram capazes de inibir significativamente o crescimento dos fungos *Fusarium lateritium* e *F. oxysporum*. Peroxidases são enzimas que têm sido implicadas em uma grande variedade de processos fisiológicos em plantas, tais como biossíntese de lignina, polimerização de extensinas, metabolismo de auxina, indução por injúria mecânica e resistência a doença (SIEGEL, 1993). As peroxidases da casca da soja são muito estáveis a altas temperaturas, extremos de pH e também a solventes orgânicos

(NISSUM *et al.*, 2001). A enzima madura contém uma elevada identidade (70%) com peroxidases de outras leguminosas, recrutadas em várias respostas de defesa (HENRIKSEN *et al.*, 2001).

Com relação aos cotilédones, várias proteínas foram identificadas através de análises proteômicas ou isolamento de moléculas individuais. Mesmo assim, muitas proteínas ainda carecem de caracterização físico-química detalhada ou de definição de seus papéis fisiológicos na planta. Das diversas proteínas isoladas e caracterizadas a partir de cotilédones de soja, muitas são capazes de causar efeitos biológicos em outros organismos e, freqüentemente, estão envolvidas no mecanismo de defesa da planta contra patógenos e herbívoros. Esse é o caso dos inibidores de protease (SBTI) e da aglutinina da soja (GRANT, 1989). Para os inibidores tripsina tipo Kunitz (KTI) de soja, dados experimentais mostram que essas moléculas, além de limitarem o crescimento e desenvolvimento de insetos, são consideradas também alérgenos das sementes de soja, onde correspondem a 6% em massa (JANSEN *et al.*, 1986; BESLER *et al.*, 2000).

Yeboah e colaboradores (1998) descreveram a purificação de uma endoquitinase classe III de sementes secas de soja de massa molecular aparente de 28 kDa e pI 5,7 e analisaram, através da obtenção de seu cDNA, sua identidade com outras quitinases já descritas, classificando-a como um novo membro da PR-8, uma das famílias de proteínas relacionadas à patogênese.

Embora os trabalhos anteriores tenham mostrado que as sementes de soja possuem diversas atividades biológicas relacionadas à defesa, poucas delas têm sido exploradas do ponto de vista biotecnológico. Um dos poucos exemplos descritos na literatura envolve a expressão de inibidores de proteinases de soja em plantas de cana-de-açúcar, objetivando conferir resistência contra o lepidóptero *Diatraea saccharalis* (FALCO e SILVA-FILHO, 2003). Além disso, atividades biológicas contra nematóides e insetos, não são descritas na literatura, utilizando proteínas das sementes dessa espécie. Isso mostra a necessidade de estudos que não apenas caracterizem proteínas das sementes de soja, mas que também avaliem o seu potencial biotecnológico contra diferentes patógenos e herbívoros de importância econômica para essa espécie.

1.2 Mecanismos de Defesa de Plantas Mediados por Proteínas

As plantas desenvolveram, ao longo da evolução, sofisticados mecanismos que conferem resistência contra predadores e infecções causadas por fungos, bactérias, vírus, nematóides, dentre outros, os quais são agrupados no que chamamos de respostas de defesa (STUIVER e CUSTERS, 2001; CARLINI e GROSSI-DE-SA, 2002). A resistência conferida pelos mecanismos de defesa impede (total ou parcialmente) o estabelecimento de infecções no vegetal (resistência não-hospedeira) e com isso, minimiza os danos causados a órgãos vegetais importantes para seu crescimento e desenvolvimento como folhas, flores e sementes (JONES e TAKEMOTO, 2004).

Embora o sistema de defesa vegetal não seja mediado por anticorpos, tal como em mamíferos, as plantas são capazes de ativar uma variedade de barreiras de defesa, incluindo reforços na parede celular, acúmulo de compostos com ação antimicrobiana e pequenas moléculas derivadas do metabolismo secundário (BECERRA *et al.*, 2002; TOYODA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2007). Entre as moléculas que participam desse sistema de defesa, pode ser citado um vasto número de peptídios e proteínas, capazes de conferir proteção contra o ataque de pragas e patógenos (CARVALHO e GOMES, 2009). Esses compostos estão concentrados principalmente nas sementes, tendo em vista ser o órgão responsável pela propagação e sobrevivência das espécies (CARLINI e GROSSI-DE-SA, 2002).

Um dos grupos mais notáveis de proteínas envolvidas na defesa vegetal é o das proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), tal como as quitinases (van LOON *et al.*, 2006). As plantas sintetizam sete diferentes classes de quitinases, as quais diferem não somente na localização espacial e temporal, mas, também, na estrutura, especificidade pelo substrato, mecanismos de catálise e sensibilidade aos inibidores (HAMEL *et al.*, 1997; GIJZEN *et al.*, 2001). Tem sido observado que os principais alvos para as quitinases de plantas são os fungos fitopatogênicos. De fato, várias quitinases como as de feijão, trigo, cevada, milho, tabaco, ervilha e abacaxi têm mostrado atividade inibitória tanto sobre a germinação de esporos quanto sobre o desenvolvimento das hifas (TAIRA *et al.*, 2005). Alguns autores mostraram que as quitinases podem atuar em sinergismo com outras proteínas de defesa,

dentre elas β -1,3-glucanases, proteínas inativadoras de ribossomos e osmotinas (NEHAUS, 1999).

Outras classes de peptídeos/proteínas podem participar das vias de defesa. Defensinas, tioninas, proteínas transferidoras de lipídeos e proteínas *thaumatin-like* possuem espectro de ação variado, podendo inibir o crescimento de bactérias e a multiplicação ou sobrevivência de nematóides e insetos (van LOON *et al.*, 2006). A família das defensinas vegetais é bastante diversificada quanto à atividade biológica. Há inúmeras defensinas de plantas que são antifúngicas (ALMEIDA *et al.*, 2002) e bactericidas (SEGURA *et al.*, 1998); outras defensinas apresentam atividade inseticida (PELEGRINI e FRANCO, 2005; CARVALHO e GOMES, 2009). Algumas defensinas podem se mostrar ativas simultaneamente contra diferentes tipos de patógenos, como, por exemplo, a defensina isolada de sementes de *Vigna radiata* que se mostrou tóxica para a bactéria *Escherichia coli* e larvas do inseto *Callosobruchus chinensis*, inibiu o crescimento do fungo *Rhizoctonia solani* e foi capaz de deter o crescimento de células do inseto *Spodoptera frugiperda* (CHEN *et al.*, 2002).

Inúmeros vegetais também são capazes de produzir compostos considerados altamente tóxicos não apenas para patógenos e insetos, mas também para mamíferos. Proteínas como a canatoxina, isolada de *Canavalia ensiformis* (CARLINI e GUIMARÃES, 1981), soyatoxina, soyatoxina-2 e toxina da soja, purificadas de sementes de soja (VASCONCELOS *et al.*, 1994; SOUSA, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2008), são exemplos de moléculas capazes de ocasionar convulsão e morte quando administradas pelas vias intraperitoneal e endovenosa em camundongos, além de serem deletérias para insetos-praga como *C. maculatus* e *Dysdercus peruvianus*.

Mais recentemente, um novo grupo de toxinas vegetais de natureza protéica, os ciclotídeos, tem sido amplamente descrito e relacionado à defesa vegetal contra insetos e patógenos, incluindo bactérias e fungos (TAM *et al.*, 1999; JENNINGS *et al.*, 2005; GRUBER *et al.*, 2007; CRAIK, 2009). Os ciclotídeos vegetais incluem peptídeos contendo cerca de 30 resíduos de aminoácidos e uma estrutura cíclica característica, na qual podem ser observadas três pontes dissulfeto formando um motivo chamado “nó de cistina”. A estrutura altamente compacta dessas moléculas, mantida por pontes dissulfeto, as tornam extremamente estáveis a temperaturas elevadas,

condições químicas diversas e a digestão enzimática (CRAIK, 2001; CRAIK, 2009).

Apesar de muitas moléculas participarem do processo de resistência vegetal à predação ou infecção, as proteínas têm recebido atenção especial em virtude da potencialidade de aplicações na agricultura. Com o advento da transformação genética de plantas, na década de 80, surgiu a possibilidade de produzir espécies agrícolas geneticamente melhoradas e resistentes a insetos, doenças e fatores abióticos adversos (TERRAS *et al.*, 1992; OH *et al.*, 1999; DO *et al.*, 2004; CHEN, LUI e ZOU, 2006; CARVALHO *et al.*, 2006). Muitos patógenos (e também herbívoros) causam perdas agrícolas consideráveis e, para muitos desses casos, o uso de defensivos químicos não tem sido uma alternativa eficiente, além de ser ecologicamente danosa (KALPANA *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, seqüências de DNA codificando diferentes inibidores de proteinases têm sido isoladas, caracterizadas e incorporadas no genoma de importantes espécies cultivadas como arroz, batata e tabaco, nas quais têm se mostrado protetoras contra fitonematóides, lepidóteros e fungos (DO *et al.*, 2004; KALPANA *et al.*, 2005; CHEN, LUI e ZOU, 2006; CARVALHO *et al.*, 2006). Adicionalmente, muitas plantas transgênicas têm sido obtidas com o objetivo de se entender os mecanismos ou a produção de moléculas relacionadas aos processos de defesa. Independentemente da estratégia proposta, boa parte dos trabalhos publicados mostra que o conhecimento de características físico-químicas, localização subcelular, padrão de expressão no vegetal de origem e, evidência direta de atuação na defesa da planta de onde foi extraída permitem explorar de maneira mais eficiente as estratégias de defesa, levando à produção de organismos mais resistentes a doenças e herbívoros, cujo controle por outras estratégias tenha sido insatisfatório ou tóxico ao meio ambiente.

1.2.1 Proteínas Tóxicas de Origem Vegetal e seu Envolvimento nos Mecanismos de Defesa

Os vegetais produzem uma grande diversidade de proteínas envolvidas em diversos processos biológicos, tais como biossíntese da parede celular,

metabolismo de lipídeos, absorção de água a partir do solo e defesa vegetal etc. Em função da grande heterogeneidade encontrada, torna-se difícil agrupar essas proteínas com base apenas em similaridades estruturais, o que leva ao aparecimento de outros critérios de subdivisão com base em características funcionais e atividades biológicas exercidas por essas moléculas.

Uma proteína é considerada tóxica, quando é capaz interferir negativamente em algum parâmetro biológico de organismos que tenham entrado em contato com quantidades determinadas dessa molécula, através de vias específicas (endovenosa, intraperitoneal, oral). Dessa forma, pode-se dizer que a toxicidade de uma dada substância depende de fatores como: organismo teste, via utilizada e dose ou quantidade de proteína utilizada.

A toxicidade de proteínas vegetais tem sido relatada desde 1888, quando Stilmark (Estônia) descobriu que extratos de *Ricinus communis* eram extremamente tóxicos para animais, sendo essa toxicidade, posteriormente atribuída a uma proteína inativadora de ribossomo (RIP), chamada de ricina (HARTLEY e LORD, 2004).

A ricina é a RIP mais conhecida na atualidade e forma um grupo de toxinas vegetais diméricas, chamado de RIP tipo 2. Essa molécula consiste em uma cadeia A, com massa molecular aproximada de 30 kDa, ligada por uma simples ponte dissulfeto à cadeia B, que também possui massa aproximada de 30 kDa e atividade lectínica (OLSNES *et al.*, 1982). Esse padrão estrutural é diferente, porém relacionado, ao apresentado por proteínas chamadas de RIP's Tipo 1, que apresentam apenas a cadeia A e, em quantidade, representam a maioria das proteínas dessa classe. Em comum, essas proteínas apresentam a capacidade de interromper a síntese protéica devido a uma ação catalítica presente na cadeia A capaz de clivar uma ligação glicosídica entre uma molécula de adenina e outra de ribose da subunidade ribossômica 28S (HARTLEY e LORD, 2004). Em função da incapacidade em manter o processo de síntese protéica, essas moléculas acabam por ser deletérias para várias espécies como protozoários, fungos e insetos, estando possivelmente envolvidas na defesa de plantas contra pragas e patógenos (NIELSEN e BOSTON, 2001). Bertholdo-Vargas e colaboradores (2009) demonstraram, por exemplo, que a ingestão de RIP's Tipo 1 afetou negativamente o desenvolvimento e a taxa de sobrevivência dos insetos – praga *Anticarsia*

gemmatalis e *Spodoptera frugiperda*, pragas de importância agrônômica para o Brasil.

Trabalhos anteriores também mostraram que algumas lectinas vegetais, apresentaram atividades citotóxicas, fungitóxicas, ações inseticidas, nematocidas bem como foram tóxicas para animais herbívoros e mamíferos (SANTOS, 2001) evidenciando um papel fisiológico desse grupo de moléculas na defesa vegetal Além disso, variações significantes nos níveis de lectinas com atividades tóxicas e/ou antinutricionais têm sido observadas em diversas espécies de plantas como resultado de variações ambientais, como seca ou estresse salino, mostrando que essas moléculas podem ser induzidas, tal como ocorre para muitas proteínas relacionadas à defesa (OLIVEIRA *et al.*, 1994; PEUMANS e VAN DAMME, 1995; OKA *et al.*, 1997; RIPOLL *et al.*, 2003; NASI, PICARIELLO e FERRANTI, 2009).

A canatoxina (CNTX - dímero de subunidades de 95 kDa) é uma proteína tóxica purificada a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*, capaz de induzir convulsões e morte quando administrada pela via intraperitoneal ou endovenosa em ratos ou camundongos – DL₅₀ de 2 mgP/kg de massa corporal (CARLINI e GUIMARÃES, 1981). Embora suas características funcionais e tóxicas tenham sido primeiramente identificadas em mamíferos, trabalhos posteriores mostraram que essa proteína também apresenta ação inseticida contra espécies de importância agrícola. *Rhodnius prolixus*, *Callosobruchus maculatus*, *Nezara viridula* e *Dysdercus peruvianus* tiveram suas taxas de mortalidade aumentadas quando alimentados com dieta contendo CNTX purificada (CARLINI *et al.*, 1997; CARLINI e GROSSI-DE-SA, 2002; STANIQUASKI *et al.*, 2005).

CNTX é, na verdade, uma isoforma de urease cujos efeitos entomotóxicos independem de sua atividade ureolítica, mas dependem do processamento proteolítico dessa proteína no trato digestório de insetos que usam proteases do tipo catepsinas, liberando um peptídeo entomotóxico responsável pelos efeitos observados (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000). Embora o mecanismo de ação inseticida e de neurotoxicidade em mamíferos não tenham sido definidos, evidências experimentais mostram que essa proteína comporta-se como uma hemilectina, não possuindo atividade hemaglutinante direta, mas induzindo a aglutinação de eritrócitos em presença

de anticorpos anti-CNTX (CARLINI e GUIMARÃES, 1991). Em adição, respostas sugestivas de neurotoxicidade como, movimentos descoordenados de patas e antenas e paralisia reversível em doses sub-letais foram observados na espécie *Rhodnius prolixus*, mostrando que a interação com carboidratos e indução de efeitos neurotóxicos parecem estar envolvidos nas ações dessa proteína (GOMBAROVITS, 1999).

Extratos protéicos produzidos a partir de sementes de soja foram também capazes de induzir convulsões e morte quando injetados em camundongos. Nesses extratos foram detectadas proteínas tipo CNTX-like, capazes de reagir com anticorpos produzidos contra essa proteína. Em 1994, Vasconcelos e colaboradores isolaram a soyatoxina (SYTX), uma proteína (21 kDa) de sementes de soja, tóxica para camundongos por via i.p. (DL₅₀ 7-8 mg/kg de peso corpóreo), sendo capaz de produzir dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas que precedem a morte do animal, representando portanto, um dos princípios responsáveis pela toxicidade atribuída ao extrato total dessa espécie.

SYTX não apresenta atividade enzimática, atividade hemaglutinante direta ou atividade inibitória de tripsina e, bioquimicamente, é uma proteína ácida de ponto isoelétrico entre 4,4 e 4,6, sendo capaz de formar complexos protéicos de massa molecular em torno de 100 kDa, visualizados em géis de poliacrilamida. Esses complexos são, assim como a SYTX, reconhecidos por anticorpos anti-CNTX (VASCONCELOS *et al.*, 1994). As atividades de SYTX relacionadas à defesa vegetal não foram descritas, porém, SYTX induz alterações severas no pâncreas de ratos, quando presentes em dietas experimentais (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

Outra neurotoxina protéica também presente em sementes de soja, e distinta da SYTX, foi isolada por Siebra (1998), tendo sido denominada de “toxina da soja” (SBTX). Esta toxina, por via i.p. ou i.v., foi também tóxica para camundongos (DL₅₀ 6,0 ± 0,41 e 5,6 ± 0,23 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente), produzindo os mesmos efeitos descritos após a administração de SYTX. A caracterização físico-química de SBTX realizada por Vasconcelos *et al.* (2008) mostrou que essa proteína possui massa molecular de 44 kDa, sendo formada por duas cadeias polipeptídicas de 27 e 17 kDa, unidas por pontes dissulfeto, as quais só se dissociam após o tratamento da

proteína com β -mercaptoetanol 5%. Tal como ocorre para SYTX, a atividade tóxica de SBTX parece depender de grupos tióis reduzidos, visto que essa atividade foi mantida quando a toxina foi armazenada a 4 °C e em presença de DTT 5 mM. Anticorpos anti-SBTX, mostraram reação cruzada com SYTX e CNTX, mostrando que essas toxinas dividem determinantes antigênicos comuns (VASCONCELOS *et al.*, 2008). O sequenciamento da extremidade NH₂-terminal de SBTX mostrou que a cadeia de massa molecular de 27 kDa apresenta 80% de identidade com a seqüência de aminoácidos de uma proteína ligante de carboxilatos, isolada a partir da casca de sementes de soja, ao passo que a cadeia de 17 kDa apresenta identidade de 96% com uma ciclofilina também presente em sementes de soja (DHAUBHADEL *et al.*, 2005). Adicionalmente, SBTX foi capaz de inibir do crescimento micelial de *Cercospora sojina*, bem como dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicilium hergueli*, evidenciando a participação dessa proteína na defesa da soja contra fungos fitopatogênicos. Além disso, essa proteína foi induzida em sementes após tratamento com concentrações crescentes (da ordem de 50 μ M) de ácido jasmônico, tal como ocorre com muitas proteínas relacionadas à patogênese (MORAIS, 2007).

Partindo do protocolo de purificação descrito por Vasconcelos e colaboradores (1994) para obtenção de SYTX, Sousa (2006) obteve uma terceira proteína, ou isoforma de SYTX, de massa molecular 28 kDa, chamada de SYTX-2, dotada de atividade tóxica (DL₅₀ 4,5 mgP/kg) para camundongos, com a mesma sintomatologia e sinais clínicos descritos anteriormente para SYTX e SBTX. Esse dado mostra que a soja possui, pelo menos, três proteínas responsáveis pela indução de toxicidade atribuída ao extrato total de sementes. Tal como descrito para SBTX, evidências experimentais mostram que essa proteína também está envolvida nos mecanismos de defesa da planta, particularmente contra insetos, já que foi capaz de alterar negativamente diversos parâmetros do ciclo biológico de *C. maculatus* (emergência, índice de crescimento e tempo médio de desenvolvimento), além de induzir mortalidade em *D. peruvianus*. De forma contrária, SYTX-2 não foi capaz de inibir a germinação e o crescimento de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola.

1.2.2 Potencial Biotecnológico de Proteínas Envolvidas na Defesa Vegetal

A proteção de plantas de interesse agrícola contra doenças tem sido um dos maiores desafios dos últimos anos, em especial quando se considera a proteção contra fungos fitopatogênicos e nematóides, os maiores causadores de perdas agrícolas na atualidade (KIRUBAKARAN e SAKTHIVEL, 2007).

Além da aplicação seriada de fungicidas e nematicidas à lavoura, as técnicas de melhoramento genético tradicional e o controle biológico figuram entre as metodologias mais utilizadas. Entretanto, com o início da era da biologia molecular de plantas na década de 80, outras abordagens têm sido aplicadas. Essas abordagens envolvem a identificação, caracterização e clonagem de genes envolvidos na defesa vegetal cujos produtos (proteínas ou metabólitos secundários) são capazes de promover inibição de crescimento ou germinação de estruturas fúngicas e formas infectivas de nematóides. Adicionalmente, essas técnicas têm permitido conhecer as funções e os mecanismos de defesa de muitas espécies de plantas (PUNJA, 2001).

Pesquisas recentes relacionadas à aplicação de técnicas de biologia molecular e biotecnologia, com foco na interação patógenos e hospedeiro, têm permitido identificar, caracterizar e clonar inúmeros genes envolvidos na defesa de plantas seguindo-se a infecção por patógenos. De acordo com essas metodologias, os candidatos prováveis a serem (e que estão sendo) utilizados no desenvolvimento de espécies resistentes são genes envolvidos na expressão de:

- Produtos que são diretamente tóxicos para os fungos ou que interferem em seu crescimento. Esses compostos incluem PR-proteínas (quitinases e glucanases), proteínas antifúngicas (osmotinas e “taumatina-like”), peptídeos antimicrobianos (tioninas, defensinas etc) e proteínas inativadoras de ribossomos (BOLAR *et al.*, 2000);
- Produtos que destroem ou neutralizam parte do arsenal bioquímico do patógeno, como poligalacturonases, ácido oxálico e lipases (POWELL *et al.*, 2000);
- Produtos que podem aumentar a defesa estrutural dos vegetais, como peroxidases (DONOFRIO e DELANEY, 2001);

- Produtos capazes de liberar sinais que controlam as respostas de defesa (HEATH, 2000);
- Produtos de genes de resistência (R) envolvidos no reconhecimento dos genes Avr de patógenos (COOLEY *et al.*, 2000).

A utilização de proteínas antifúngicas como estratégia de biocontrole de fungos fitopatogênicos é baseada em trabalhos experimentais preliminares, que identificaram e analisaram sua atividade *in vitro* contra diferentes patógenos. Essencialmente, uma proteína é dita antifúngica ou fungitóxica, quando é capaz de interferir com o crescimento ou reprodução de determinadas espécies de fungos. Como mecanismo geral de ação, essas proteínas compartilham a capacidade de hidrolisar polímeros que constituem a parede celular, como quitinases e glucanases, ou de ativar respostas celulares que interferem na formação direta da parede celular (NG, 2004).

Mesmo sabendo que alguns dos genes que codificam esses produtos protéicos já podem ser encontrados nos próprios vegetais, conhecendo-se o seu perfil de expressão temporal e espacial, pode-se otimizar a obtenção de seu respectivo produto em uma escala de tempo mais apropriada e capaz de interferir na colonização do patógeno ou, mesmo, aumentar seus níveis nas estruturas parasitadas (PUNJA, 2001). É o que ocorre com as PR-proteínas, que podem se acumular em resposta à infecção por parte de vírus, bactérias e fungos. Muitas dessas proteínas possuem atividade antifúngica direcionada para patógenos diferentes ou para uma grande família de fungos relacionados (van LOON, 2006).

Apesar de muitas proteínas ativas *in vitro* terem aumentado a resistência de transgenes a doenças, nem sempre essa metodologia tem sucesso, visto que várias delas possuem ação específica contra determinadas raças de patógenos (SCHICKLER e CHET, 1997). De forma contrária, algumas proteínas de defesa mostram atividades antifúngicas contra diversos patógenos não relacionados e são capazes de conferir resistência a todos eles quando utilizadas em plantas transgênicas (PELEGRINI e FRANCO, 2005).

Diversas espécies mostram resistência aumentada à infecção quando são utilizadas combinações de várias proteínas antifúngicas, ao invés de terem sido transfetadas com genes para apenas uma delas. Em plantas de tabaco, a co-produção de quitinases e β -1,3-glucanases resultou numa substancial

proteção contra *Cercospora nicotianae*, diferentemente da que foi conferida quando essa espécie foi transfectada com apenas um dos genes (ZHU *et al.*, 1994).

As fontes vegetais de proteínas antifúngicas podem incluir espécies de leguminosas e, também, não leguminosas e não necessariamente devem pertencer à classe de quitinases ou β -1-3-glucanases. NAKAJIMA e colaboradores (1997) mostraram que a expressão de uma lisozima humana em plantas de tabaco resultou na resistência aumentada ao fungo *Erysiphe cichoracearum*. Outra proteína de massa molecular 15 kDa foi isolada de *Panax notoginseng* e essa molécula exerceu potente atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (NG, 2004).

Ainda que haja muitos entraves, é importante ressaltar que, em relação ao melhoramento genético convencional ou assistido por marcadores moleculares, a produção de organismos geneticamente modificados parece ser a estratégia de controle biológico mais viável, embora os custos para a obtenção de espécies transgênicas sejam mais elevados. Além disso, muitas espécies que expressam proteínas heterólogas tornam-se resistentes não apenas a uma, mas a vários fungos diferentes ou relacionados filogeneticamente, outra grande vantagem em relação ao melhoramento tradicional. Adicionalmente, a barreira representada pelo cruzamento interespecífico também é eliminada, o que abre a potencialidade de utilização dessas proteínas em todo e qualquer organismo capaz de ser regenerado *in vitro* para o qual um protocolo de transformação tenha sido descrito.

2. HIPÓTESES

Tal como descrito, as sementes de soja apresentam uma grande diversidade de proteínas, muitas das quais estão envolvidas ou relacionadas à defesa da planta. Embora sejam importantes para o vegetal, em função da escassez de estudos bioquímicos e funcionais, não são utilizadas como alvos biotecnológicos no controle de patógenos e pragas de interesse agrícola. Por conta disso, o controle de muitos patógenos como *M. incognita* e *P. pachyrhizi* ainda é feito de forma ineficiente com fungicidas e nematicidas, levando a prejuízos ambientais e econômicos. Considerando as premissas descritas acima, esta tese foi proposta com o objetivo de testar as seguintes hipóteses:

- 1- As toxinas protéicas SYTX-2 e SBTX são moléculas envolvidas no processo de defesa da planta, particularmente contra o ataque de patógenos.**

- 2- Em função do possível papel de defesa vegetal atribuído a essas proteínas, pode-se dizer que a sua expressão é distribuída por todas as partes do vegetal, estando SYTX-2 e SBTX concentradas nos órgãos relacionados às suas atividades biológicas.**

***Caracterização
Bioquímica e Funcional da
Soyatoxina-2***

1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Estudos proteômicos realizados com sementes de soja mostraram que essa leguminosa apresenta, pelo menos, 600 proteínas diferentes, 7% das quais relacionadas à defesa, embora menos de 10% dessas proteínas sejam exploradas com relação ao potencial para biocontrole de patógenos e pragas, não obstante às grandes perdas agrícolas causadas na lavoura (HAJDUCH *et al.*, 2005). Isso mostra que, em dissonância à grande quantidade de informações fornecidas pelo genoma dessa espécie, pouco se conhece a respeito de proteínas de defesa expressas nas sementes no que diz respeito à sua caracterização bioquímica e funcional. Além disso, das proteínas identificadas e parcialmente caracterizadas, poucas (menos de 1%) são estudadas com relação ao seu perfil de expressão no vegetal, o que mostra que a soja contém um variado repertório de moléculas de defesa ainda pouco exploradas ou, mesmo, subestimadas em programas de melhoramento vegetal.

Sabe-se que o estudo funcional de moléculas utilizando caracterização bioquímica e análise proteômica fornece dados importantes que complementam o estudo do genoma, permitindo assim, a descoberta mais precisa da estrutura e função de genes, dentro das milhares de sequências de nucleotídeos disponíveis e ainda sem função definida.

A Soyatoxina-2 (28 kDa) é uma proteína tóxica isolada de sementes de soja que, através de ensaios *in vivo*, se mostrou deletéria para os insetos-praga *C. maculatus* e *Dysdercus peruvianus*, dados esses que evidenciam um papel dessa proteína na defesa da planta (SOUSA, 2006). Embora tenha sido parcialmente caracterizada, muitas informações acerca de sua estrutura primária, secundária, estabilidade térmica, biodistribuição tecidual e participação na defesa contra nematóides, por exemplo, ainda são desconhecidas. Isso mostra que muitos dos aspectos funcionais dessa proteína também não foram descritos, apesar da sua presença em sementes de várias cultivares fornecidas pela EMBRAPA, tal como mostrado em ensaios de toxicidade contra camundongos (VASCONCELOS *et al.*, 1997; SIEBRA, 2004; SOUSA, 2006; MORAIS, 2007; MAIA, 2008).

Este capítulo está sendo proposto, portanto, com o objetivo de responder as seguintes perguntas:

- *Existe algum parâmetro estrutural ou funcional de SYTX-2, comum àqueles apresentados por CNTX e SBTX?*

- *Em adição à toxicidade apresentada contra insetos, seria essa proteína também efetiva contra patógenos de interesse agrônômico para a soja?*

- *Sabe-se que a defesa contra insetos envolve mecanismos bioquímicos ativados após injúria mecânica de tecidos vegetais. Seria SYTX-2 induzida após injúria tecidual?*

- *Embora tenha sido obtida a partir de sementes, SYTX-2 pode ser detectada em outras partes do vegetal? Em caso positivo, existe expressão diferencial em raízes, caules e folhas?*

- *Existe alguma correlação entre os níveis de expressão apresentados nos diferentes órgãos vegetativos e suas atividades determinadas contra patógenos e pragas?*

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- ◆ Caracterizar bioquímica e funcionalmente a Soyatoxina – 2 dentro do contexto da defesa vegetal.

2.2 Específicos

- ◆ Avançar na caracterização físico-química e estrutural da Soyatoxina-2 através de determinação do(a): sequência NH₂-terminal, ponto isoelétrico, espectro de fluorescência, espectro de dicroísmo circular, estabilidade estrutural frente a diferentes temperaturas, interação com carboidratos e atividade ribonucleásica;
- ◆ Determinar o perfil de expressão da proteína em raízes, caules, folhas jovens e adultas e cascas de sementes de soja através de ensaios imunológicos e estimar o teor de toxina apresentado em cada tecido estudado;
- ◆ Determinar o perfil de exsudação de sementes de soja em pH considerado ótimo para o plantio em solo, bem como determinar o teor de SYTX-2 presente nos exsudatos;
- ◆ Avaliar as possíveis alterações nos níveis de expressão de SYTX-2 em folhas de soja submetidas à injúria mecânica;
- ◆ Avaliar os possíveis efeitos de SYTX-2 contra diferentes espécies de fungos, sendo algumas delas, de interesse agrônomo para essa espécie;
- ◆ Determinar o efeito de SYTX-2 contra juvenis do segundo estágio larval (J2) de *M. incognita* (R4).

3. MATERIAIS

3.1 Materiais Biológicos

3.1.1 Sementes de soja

Sementes de soja não tratadas com fungicidas (cultivar BRS Pala) foram fornecidas pela Embrapa - Fundação Pró-sementes (Passo Fundo - RS) e armazenadas até o uso em frascos hermeticamente fechados e livres de infecções causadas por fungos ou ataques de insetos. Para a produção de farinha e plantio em casa de vegetação foram utilizadas sementes livres de danos mecânicos e sem alterações morfológicas perceptíveis.

3.1.2 Fungos fitopatogênicos, leveduriformes e nematóides de galha da espécie *Meloidogyne incognita*

Fusarium solani f. sp. *glycines* (isolado SDS-5) foi fornecido pela EMBRAPA (Londrina – PR). *Rhizoctonia solani* e *Phomopsis* sp. foram obtidos da micoteca mantida no Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). Os fungos foram mantidos em meios de cultura estéreis e apropriados aos seus crescimentos *in vitro*.

Candida albicans, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram mantidas em meio Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD), sendo utilizados para ensaios repiques de 24 horas em ASD, incubados a 37 °C.

Os ensaios *in vitro* de determinação de mortalidade com juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* – raça 4 - foram realizados com espécimes obtidas a partir de massas de ovos provenientes de raízes de tomateiro infectadas cerca de 60 dias antes do ensaio (HUSSEY e BARKER, 1973).

3.1.3 Animais experimentais

Para detecção da atividade tóxica de SYTX-2 foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos Swiss, machos ou fêmeas, com massa corporal entre 20 e 30 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - Campus do Pici e aclimatados em caixas plásticas contendo água e ração comercial *ad libitum* sendo submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas.

A produção de anticorpos policlonais anti-SYTX-2, a serem usados nos ensaios de imunodeteção, foi realizada em coelhos albinos machos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), adquiridos do coelhário do Departamento de Zootecnia (UFC) com 8 a 12 semanas de idade, mantidos em gaiolas apropriadas e em temperatura não superior a 25 °C. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991).

3.2 Reagentes e soluções

Reagentes utilizados para purificação, análise eletroforética (uni e bidimensional), *Western Blotting* e preparo de amostras de SYTX-2 para sequenciamento como: Acetonitrila, Tris (Ultra Pure Tris™), Inibidores de protease (PMSF e Pepstatina A), acrilamida, N,N' - metileno bisacrilamida, IgG de cabra conjugada com fosfatase alcalina produzida contra IgG de coelho, "Coomassie Brilliant Blue" (G e R) 250, nitrato de prata, ditioneitol (DTT), membranas de difluoreto polivinilideno (PVDF), β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio e marcadores de massa molecular (*Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder*) foram obtidos de empresas como Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA ou Invitrogen, EUA. As matrizes cromatográficas de DEAE-Celulose e Sepharose® 4B Ativada com Brometo de Cianogênio foram obtidas da GE HeathCare, Uppsala, Suécia. Demais reagentes de grau analítico como: cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e meios de cultura para fungos leveduriformes e fitopatogênicos foram obtidos comercialmente.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Extração e Purificação da Soyatoxina -2

A purificação de SYTX-2 foi efetuada a partir do extrato bruto de farinha de sementes de soja delipidada com éter de petróleo (1:10, m/v). Para obtenção do extrato bruto, a farinha delipidada foi suspensa no tampão de extração (Tris-HCl 25 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,1 mM, Pepstatina A 1 μ M, pH 7,5) na proporção de 1:5 (m/v). A suspensão foi mantida sob contínua agitação por 3 horas (4 °C) e, após esse intervalo, filtrada em pano de malha fina. O material retido no tecido de filtração foi re-extraído por 2 horas sob as mesmas condições e, então, filtrado. Os filtrados foram combinados e centrifugados a 10.000 x g (30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante (denominado de extrato total) precipitado com sulfato de amônio nas faixas de 0-20% (Fração 0-20%) e 20-55% (Fração 20-55%) de saturação. O precipitado obtido a partir da centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4 °C) da fração 20-55% foi dialisado (*cut-off* 12 kDa) contra o tampão de extração e submetido aos passos cromatográficos envolvidos na purificação de SYTX descritos por Vasconcelos (1994) com modificações introduzidas por Sousa (2006). Todas as etapas envolvidas no processo de purificação de SYTX-2 estão esquematizadas na **Figura 01**.

Brevemente, amostras (700 mgP) da fração 20-55% dialisada (Preparado A; Prep. A) foram aplicadas em coluna de DEAE-Celulose (15 x 2,2 cm; DE-52 Whatman[®]), previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM. Para eluição das proteínas não retidas, a coluna foi percolada (a 4 °C, em fluxo de 35 mL/hora) com tampão de equilíbrio até a completa remoção das proteínas não adsorvidas (Prep. D-I), dentre elas a toxina da soja (SBTX). Parte das proteínas retidas na coluna de troca iônica (Prep. D-II) foi eluída com a adição de NaCl 0,15 M ao tampão de equilíbrio, sob mesmo fluxo usado para eluição do material não retido. As frações (Prep. D-III) contendo SYTX-2 foram eluídas através da aplicação de um gradiente salino linear (0,15 – 0,7 M de cloreto de sódio) à coluna de DEAE-Celulose sendo coletadas (coletor Pharmacia[®] LKB FRAC-100) frações de 3 mL (fluxo 45 mL/h) as quais foram monitoradas pela

absorbância a 280 nm e avaliadas através de detecção da atividade tóxica em camundongos pela via endovenosa (e.v.). Com o objetivo de remover inibidores de tripsina presentes no material tóxico proveniente do gradiente salino, as frações foram reunidas, concentradas e aplicadas em coluna de Sepharose® 4B anidrotripsina. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M. As proteínas não retidas (Prep. S-I; contendo atividade tóxica) foram eluídas com o próprio tampão de equilíbrio. Para eluição do material retido na coluna (Prep. S-II; correspondente ao inibidor de tripsina de soja, SBTI), foi aplicado tampão Glicina-HCl 0,05 M, pH 2,2. As frações obtidas nos processos cromatográficos foram monitoradas através de absorbância a 280 nm e analisadas eletroforéticamente (LAEMMLI, 1970) para verificar o grau de pureza do material obtido.

Nas análises por eletroforese, amostras protéicas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0% e β -mercaptoetanol 1%. Em seguida, essas amostras foram aquecidas a 100 °C, por 10 minutos, centrifugadas a 10.000 x g, por 5 minutos (10 °C) e receberam azul de bromofenol 0,1% para acompanhamento da corrida eletroforética. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, Amersham Biosciences), onde os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V e amperagem 20 mA. Como marcador de massa molecular foi utilizado o kit *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). A coloração do gel foi efetuada com Coomassie Coloidal (WANG, LI e LI, 2007).

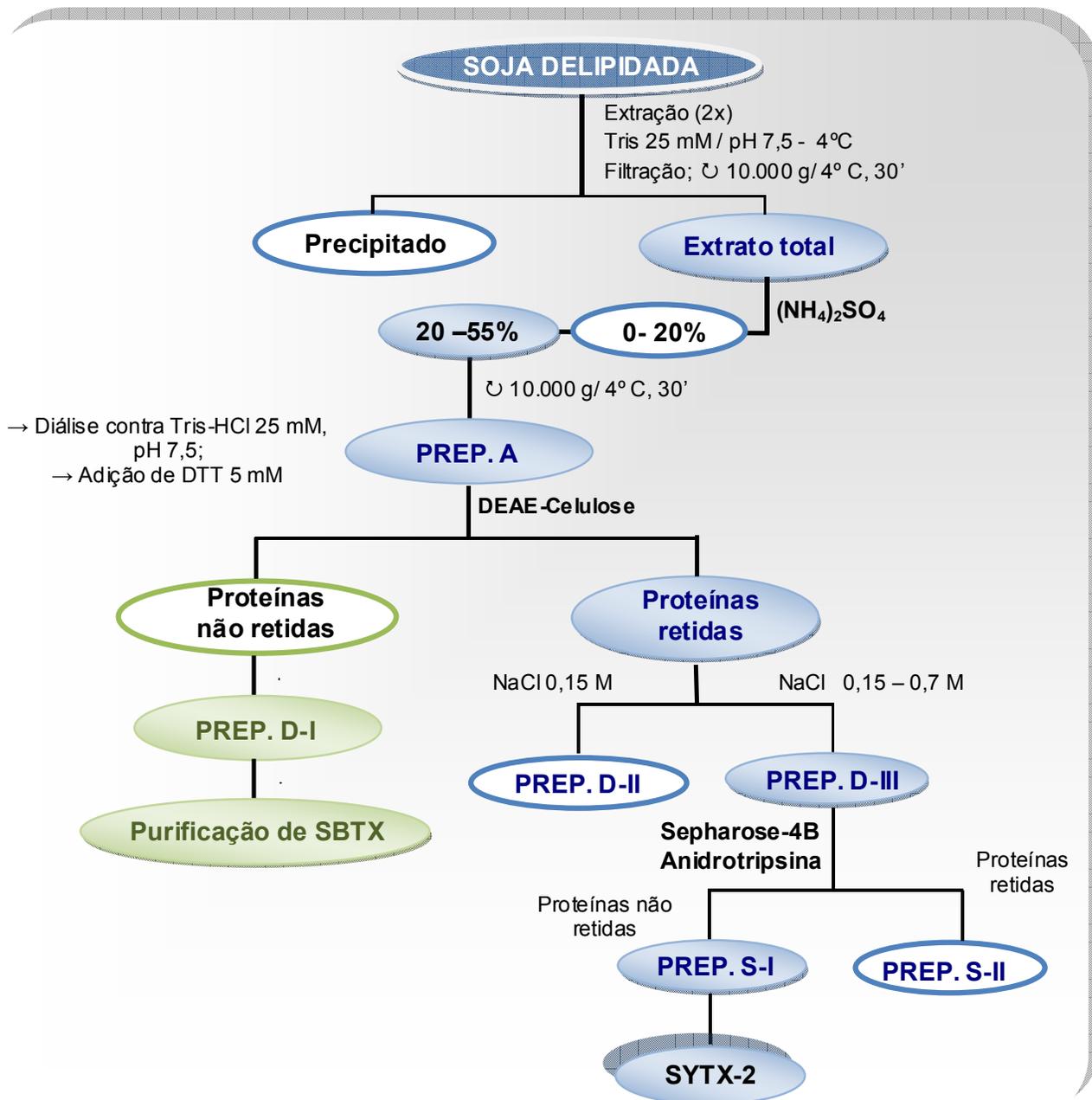


Figura 01. Esquema geral de purificação da SYTX-2 descrito por Vasconcelos (1994) e modificado por Sousa (2006). Todas as etapas indicadas como “Prep.” indicam preparados obtidos ou submetidos aos passos cromatográficos mostrados.

4.1.1 Determinação do teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas totais foi feita pelo método colorimétrico de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. Alternativamente, as proteínas eluídas nos passos cromatográficos, como já descrito, foram avaliadas pelas leituras das absorbâncias a 280 nm.

4.1.2 Detecção e dosagem da atividade tóxica

Para determinação da atividade tóxica do extrato total e da fração 20-55%, diferentes doses (mgP/kg de massa corporal) de proteínas foram administradas na cavidade peritoneal de camundongos (3 animais/dose), sendo observados a sintomatologia e o tempo de sobrevivência dos animais 12-24 horas após injeção. A atividade tóxica das frações obtidas dos passos cromatográficos foi avaliada através de injeção endovenosa de volume não superior a 250 μ L de cada fração sendo observada a sobrevivência dos animais 1-2 horas após a injeção. A Dose Letal Mediana (DL_{50}) foi calculada usando-se a média do número total de camundongos mortos por dose de proteína administrada em três ensaios independentes (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

4.2 Caracterização Bioquímica da SYTX-2

4.2.1 Sequenciamento NH_2 - Terminal

Para obtenção da seqüência de aminoácidos NH_2 -Terminal de SYTX-2 amostras contendo cerca de 1mg/mL (20 μ g/poço) da toxina foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo os parâmetros descritos anteriormente. Após eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas (Sistema "Trans Blot", *Multiphor II Pharmacia-LKB*) para membrana de PVDF, durante 2 horas (50 V, 80 mA). Em seguida, a membrana de PVDF foi saturada com metanol 100% e corada com Comassie Brilliant Blue R-250 por 10 minutos. A membrana foi, então, descorada com metanol 50% até a visualização da banda protéica referente à Soyatoxina-2. A banda protéica de massa molecular 28 kDa

foi recortada, lavada exaustivamente com metanol 50% para completa remoção do corante e submetida ao sequenciamento automatizado de proteínas, seguindo o método de degradação de Edman, utilizando o equipamento Shimadzu PPSQ-10 do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). Todo o procedimento foi realizado em cinco repetições para determinação da sequência da proteína em estudo. As seqüências obtidas foram comparadas àquelas depositadas nos bancos de dados *Protein Data Bank*, *Swiss Prot* e NCBI por meio do pacote de algoritmos de busca BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST; ALTSCHEL *et al.*, 1990).

4.2.2 Análises espectroscópicas

4.2.2.1 Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência de SYTX-2 foram determinados partindo-se de amostras de toxina 0,5 mg/mL completamente solubilizadas em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, as quais foram excitadas em 280 nm e 295 nm e seus espectros registrados de 300 nm a 440 nm em espectrofotômetro Perkin-Elmer utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

4.2.2.2 Espectroscopia de dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular (*CD - circular dichroism*) foi determinado para SYTX-2 nativa 0,5 mg/mL, diluída em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As medidas foram feitas em espectropolarímetro Jasco, modelo J 720, em um intervalo de 185 a 260 nm utilizando-se cubeta de quartzo cilíndrica de 0,2 cm de caminho óptico.

Para determinação das componentes de estrutura secundária, utilizou-se o programa Selcon-2 desenvolvido por Sreerama e Woody (1993), o qual tem por função extrair as cinco componentes puras associadas à formação da estrutura secundária de proteínas de um grupo de espectros de referência no qual o espectro da proteína analisado é adicionado.

A estabilidade da SYTX-2 foi também determinada utilizando-se CD, frente a diferentes temperaturas. As amostras de SYTX-2 0,5 mg/mL foram dissolvidas

em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e incubadas de 25 °C a 95 °C durante 10 minutos em cada temperatura antes das determinações do espectro CD.

Além disso, as modificações na estrutura secundária de SYTX-2 submetida a temperaturas decrescentes foram determinadas tomando-se como ponto de partida a temperatura máxima de perda de estrutura secundária (95 °C) e atingindo-se a temperatura usada para determinação do espectro CD de SYTX-2 nativa (25 °C). A amostra utilizada foi preparada seguindo-se as mesmas condições descritas anteriormente.

Todas as análises espectroscópicas foram realizadas no Laboratório de Biofísica e Espectroscopia do Instituto de Física de São Carlos – USP.

4.2.3 Eletroforese Bidimensional

A determinação do ponto isoelétrico de SYTX-2 foi efetuada através de eletroforese bidimensional seguindo o protocolo descrito e modificado por Görg *et al.*, 2000. Amostras de SYTX-2 (100 µg) foram ressuspensas em 200 µL de tampão de re-hidratação composto por uréia 8 M, 7 mg de DTT, CHAPS 2%, azul de bromofenol e 2% de IPG Buffer (pH 3-10; GE Healthcare), centrifugadas a 10.000 x g durante 5 minutos e aplicados em tiras (*strips*) de 11 cm com variação não linear de pH de 3 a 10, sendo deixados em repouso *overnight* (aproximadamente 12 h). A focalização isoelétrica foi executada de acordo com os seguintes parâmetros: 2 mA, 5 W e 500 V durante 30 minutos, 1000 V durante 30 minutos, 3500 V por 30 minutos e 3500 V constantes durante 5,5 h. Em seguida, as *strips* foram imersas em uma solução de equilíbrio contendo uréia 6 M, DTT 1%, SDS 2% e azul de bromofenol durante 15 minutos e, submetidas à separação na segunda dimensão por SDS-PAGE (12,5%) de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Nessa etapa foram usadas placas de (18 x 24 x 0,15 cm) e as corridas foram conduzidas a 250 V, 50 mA e 10 W durante 6 horas em temperatura constante de 20 °C. A coloração do gel foi efetuada utilizando Coomassie Coloidal (WANG, LI e LI, 2007). Os géis obtidos foram digitalizados (*LabScan software*) e analisados utilizando o programa *Image Master TM 2D Platinum v. 7.0* (GE Healthcare).

4.2.4 Efeito da SYTX-2 Sobre Eritrócitos de Coelho

A determinação da atividade hemaglutinante direta de SYTX-2 foi realizada através do método descrito por Vasconcelos *et al.*, 1991. Os ensaios foram realizados com amostras de SYTX-2 liofilizadas e diluídas (20 mg/mL) serialmente em solução salina (NaCl 0,15 M) estéril, as quais foram incubadas (100 µL) em microplacas plásticas de titulação contendo 100 µL de uma suspensão de 2% de eritrócitos de coelho. A placa foi incubada por 1 h em 37 °C e, após esse intervalo, foi analisada para detecção de eritrócitos aglutinados. Alternativamente, alíquotas das amostras incubadas foram avaliadas quanto à presença de hemólise. Como controle foi utilizado apenas solução salina estéril ou amostras da fração 20-55% (que contém lectina da soja – SBA) como controle positivo.

Em adição ao ensaio de hemaglutinação direta foi também realizado o ensaio de hemaglutinação indireta, descrito por Carlini e colaboradores (1985). Nesse protocolo, eritrócitos de coelho foram incubados em presença de SYTX-2 tal como descrito na atividade de hemaglutinação multivalente. Após 1 h de incubação a 37 °C 100 µL da suspensão de eritrócitos incubada com SYTX-2 foram retirados e adicionados 100 µL de IgG anti-SYTX-2 policlonal (0,5 mg/ml ou 50 µg/poço) deixando-se a placa, novamente, sob as mesmas condições. Como controle desse grupo experimental, os eritrócitos (2%) foram incubados somente com IgG policlonais anti-SYTX-2. Os resultados das atividades hemaglutinantes, direta e indireta, foram expressos em unidades de hemaglutinação (UH) determinadas a partir do inverso do título da maior diluição, na base 2, que ainda apresentou aglutinação visível e, em atividade específica obtida pelo cálculo de UH/mg de proteína.

O ensaio de hemaglutinação indireta foi também realizado com amostras de SYTX-2 incubadas previamente (30 min, temperatura ambiente) com diferentes monossacarídeos e com a glicoproteína mucina, objetivando definir os possíveis açúcares inibidores da atividade hemaglutinante observada. Nesse ensaio, foram utilizadas 4 UH de SYTX-2/poço, as quais foram incubadas com soluções de 0,1M de glicose, manose, galactose, *N*-acetil-D-glucosamina ou D-fucose ou, ainda, 2,5 mg/mL de mucina. Todos os demais parâmetros do ensaio

foram realizados tal como descrito anteriormente, sendo os mesmos realizados em duplicada e em três repetições.

4.2.5 Atividade Ribonucleásica

A atividade ribonucleásica de SYTX-2 foi determinada em tubos de ensaio de acordo com a metodologia descrita por Tuve e Anfinsen (1960) modificada por Gomes-Filho e Enéas-Filho (1991) utilizando RNA de leveduras (*torula yeast*) tipo IV (Sigma Chemical, Co.) como substrato. O substrato (0,2%; 1 mL) foi dissolvido em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,8 e foi incubado em presença de 1,5 mL SYTX-2 (0,35 mgP/mL) dissolvida em Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. Como controle foi utilizado apenas Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 (1,5 mL). Os tubos foram incubados em banho maria a 40 °C e após 60 minutos a reação foi interrompida através da adição de acetato de uranila 0,75% dissolvido em HClO₄ 25%. Em seguida, os tubos foram deixados em banho de gelo (~ 2°C) por 20 minutos, foram centrifugados (3.000 rpm, durante 10 minutos) e a presença de nucleotídeos livres em solução resultante da hidrólise de RNA foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 260 nm. A atividade enzimática específica foi expressa em UA x (h x mgP)⁻¹ sendo uma unidade de atividade (UA) definida como uma diferença de absorbância em 260 nm igual a 0,01.

4.3 Distribuição Tecidual de SYTX-2 em Sementes, Plantas Jovens e Adultas de *Glycine max*

4.3.1 Produção de Anticorpos Policlonais

A distribuição tecidual de SYTX-2 em sementes e plantas de soja foi determinada utilizando-se como ferramenta anticorpos policlonais produzidos em coelho contra SYTX-2. Antes de ser iniciado o processo de imunização, uma amostra de sangue dos animais foi utilizada para obtenção do soro pré-imune. Para a produção de anticorpos policlonais, os animais foram imunizados com uma emulsão contendo cerca de 200 µg de SYTX-2 obtidos a partir de bandas provenientes de géis de poliacrilamida 12,5 %. Após a corrida eletroforética os

géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue 0,25% para detecção e excisão das bandas referentes à SYTX-2, as quais foram descoradas e maceradas em 0,5 mL de NaCl 0,15 M estéril e 0,5 mL de adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical, Co.). Coelhos albinos de, aproximadamente, 4 kg foram aclimatados uma semana antes do processo de imunização que consistiu na administração subcutânea de 200 µg do antígeno em dez sítios dispostos bilateralmente ao longo da região tóraco-lombar da coluna vertebral dos animais. Vinte e um dias após a primeira inoculação, uma nova aplicação de proteína (200 µg) foi realizada, também pela via subcutânea. Nessa e em todas as demais imunizações o antígeno foi preparado conforme descrito anteriormente, mas usando o adjuvante incompleto de Freund. A segunda imunização foi acompanhada pela coleta de cerca de 10 mL de sangue, para obtenção do primeiro soro imune. Duas outras coletas (10 mL) foram realizadas em intervalos de 10 dias após a segunda imunização, sendo essas também acompanhadas pela administração de 200 µg de antígeno. Os anti-soros obtidos nas coletas foram reunidos, precipitados com sulfato de amônio sólido a 33% de saturação e, em seguida, dialisados em trocas alternadas com água bidestilada e tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, a cada 6 horas, durante três dias. O dialisado (última troca realizada com água Milli-Q®) foi, então, centrifugado (15.000 x g, 20 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a 2 °C para posterior uso nos experimentos de imunodeteção (**Figura 02**).

4.3.2 Determinação do Título e da Especificidade dos Anticorpos Produzidos

O título e a especificidade dos anticorpos produzidos contra SYTX-2 foram determinados através da metodologia de *Western Blotting* descrita por Towbin e colaboradores (1979). Esse método representa uma combinação de técnicas de eletroforese e imunodeteção com o objetivo de visualizar a especificidade da interação antígeno-anticorpo através de imunoreação. No protocolo experimental aqui utilizado, amostras (10 µg) de SYTX-2 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % - SDS-PAGE (LAEMMILI, 1970) e, em seguida, foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond C® - GE Healthcare) durante 30 minutos, 400 mA, 15V. Para avaliação da eficiência da transferência

de proteínas para membranas de nitrocelulose foi utilizada a solução de marcadores *Benchmark Pre-stained Protein Ladder* (Invitrogen®) que apresenta proteínas (10 kDa a 190 kDa) ligadas covalentemente a corantes específicos que permitem a visualização das bandas protéicas durante a eletroforese e, também, após a eletrotransferência sem a necessidade de coloração da membrana de nitrocelulose. Após transferência, as membranas de nitrocelulose foram colocadas em tampão de bloqueio de sítios inespecíficos, composto de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05% e 5% de leite em pó desnatado, sendo deixadas sob leve agitação durante, aproximadamente, 12 horas. Subsequentemente, as membranas foram imersas em solução de anticorpo primário anti-SYTX-2 ou soro pré-imune (branco) em diferentes diluições e mantidas por quatro horas a 37 °C. O anticorpo primário foi preparado a partir de uma solução contendo 1 mg do anticorpo em 1 mL de tampão de bloqueio sem leite e foi utilizado nas diluições 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500 e 1:1000. Após essa etapa, as membranas foram lavadas pelo menos cinco vezes com o tampão de bloqueio sendo, então, incubadas em presença do anticorpo secundário 1:1000 (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina), a 37° C, por duas horas. A membrana foi novamente lavada com o mesmo tampão e, por fim, revelada com o substrato cromogênico da fosfatase alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT).

O título dos anticorpos anti-SYTX-2 foi também determinado utilizando a técnica de *Dot Blotting*. Para isso, 10 µL de toxina (1 mg/mL em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5) foram aplicados sobre membrana de nitrocelulose e deixados secar. Todas as demais etapas do ensaio foram realizadas conforme descrito para a técnica de *Western Blotting*, exceto pelas diluições do anticorpo primário que foram de 1:100, 1:500 e 1:1000 (v/v). Nesse experimento, foi utilizado um controle experimental com o soro pré-imune como fonte de imunoglobulinas primárias.

A especificidade dos anticorpos anti-SYTX-2 foi avaliada através da técnica de *Western Blotting*, utilizando uma amostra protéica contendo frações tóxicas e não tóxicas provenientes do gradiente salino aplicado em DEAE-Celulose no processo de purificação de SYTX-2.

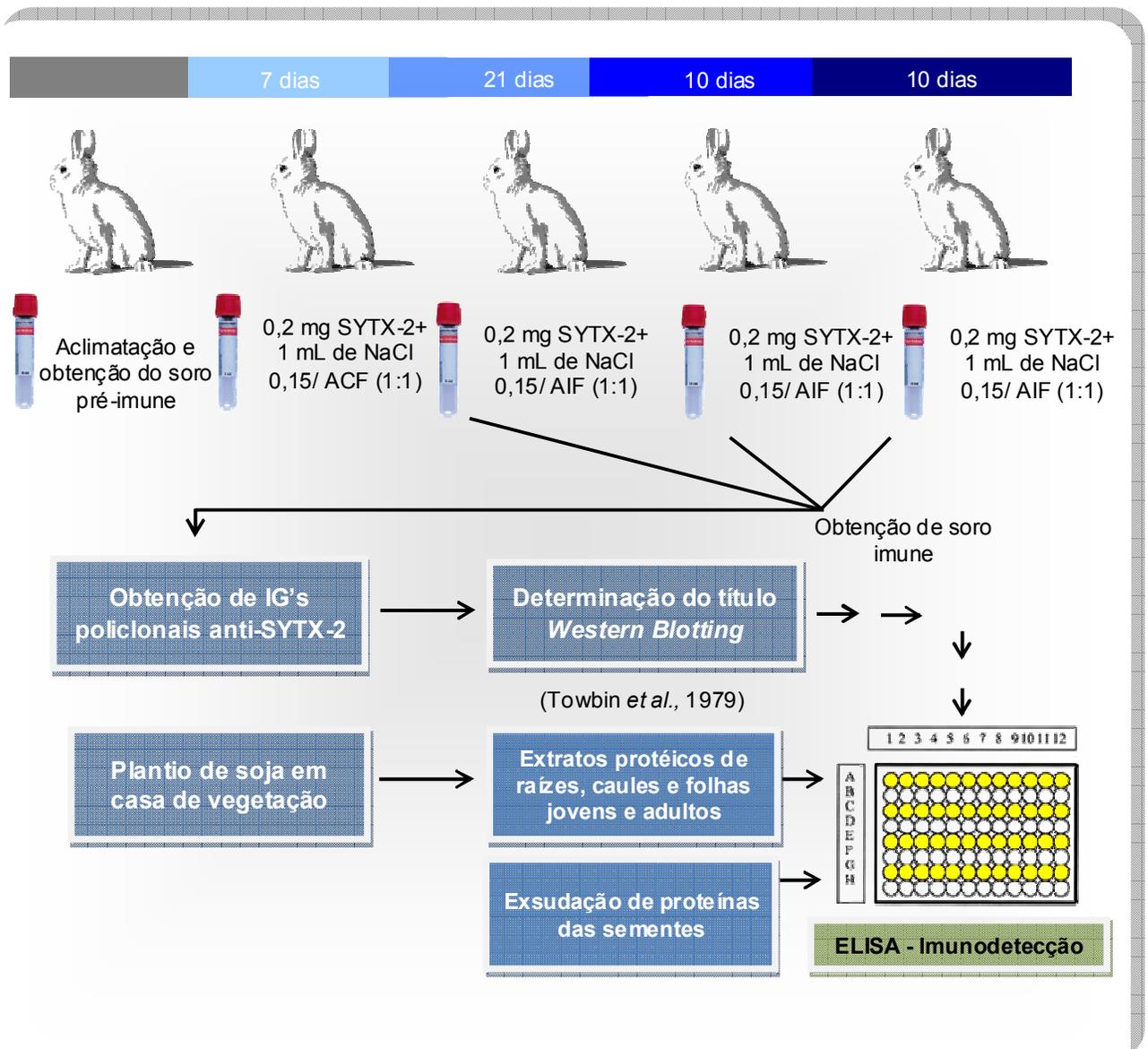


Figura 02. Esquema geral de produção e utilização dos anticorpos policlonais anti-SYTX-2 nos experimentos de imunodeteção em plantas de soja. ACF e AIF representam, respectivamente, Adjuvante Completo e Incompleto de Freund. IG's indicam imunoglobulinas. ELISA – *Enzyme Linked Imunosorbent Assay*. Na determinação do título, a técnica de *Dot Blotting* foi suprimida do esquema.

4.3.3 Detecção de SYTX-2 na Casca das Sementes de Soja

No processo de purificação de SYTX-2, farinha de soja delipidada, produzida a partir de sementes inteiras foi utilizada como material de partida. Com o objetivo de detectar se essa toxina estaria distribuída não apenas nos cotilédones, mas, também, na casca da soja, sementes da cultivar BRS - Pala foram descascadas em condições assépticas e trituradas em moinho para café para produção de farinha de granulação bem fina. As proteínas presentes na casca foram extraídas com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo PMSF 0,1 mM, DTT 5 mM e pepstatina 1 μ M, durante 4 h, 4 °C, usando-se a proporção de uma parte de farinha para cinco partes de tampão (1:5). Após extração, o material obtido foi filtrado em pano de trama fina e centrifugado a 10.000 g, 30 min, 4 °C, sendo o extrato total da casca das sementes assim obtido. A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976) e a detecção de SYTX-2 presente no extrato foi efetuada através da atividade tóxica em camundongos (descrita anteriormente) e *Dot Blotting*. O extrato obtido foi, também, analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (LAEMMLI, 1970) e, alternativamente, a atividade tóxica foi determinada utilizando amostras do extrato dialisadas contra Tris-HCl 2,5 mM, pH 7,5, contendo DTT 0,5 mM, concentradas por liofilização.

4.3.4 Exsudação de Proteínas de Sementes de *G. max*

Neste protocolo, vinte sementes de soja da cultivar BRS - Pala (massa total das sementes de 2,85 g) foram lavadas com etanol 30%, deixadas secar rapidamente e colocadas em contato com 6 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5 em temperatura de 28 °C e umidade relativa de 70% em câmara B.O.D., tal como descrito por SANTOS e colaboradores (2008). A embebição das sementes com tampão acetato foi feita em frascos tipo erlenmeyer fechados, os quais tiveram seus volumes coletados nos intervalos de tempo de 1 h, 6 h, 12 h, 18 h e 24 h após o contato inicial com o tampão. Os volumes dos exsudatos coletados foram medidos e seu teor de proteínas determinado. Além disso, os exsudatos de sementes foram analisados por eletroforese em gel de

poliacrilamida 15% (LAEMMLI, 1970) para determinação dos perfis protéicos exsudados em cada intervalo de tempo. As amostras foram preparadas tal como descrito anteriormente para a análise eletroforética de SYTX-2 sendo aplicado o mesmo volume de amostra (20 μ L) por poço. A coloração do gel foi efetuada com Coomassie Coloidal (WANG, LI e LI, 2007). Os géis obtidos foram digitalizados (*LabScan software*) e analisados utilizando o programa *Image Master TM 2D Platinum v. 7.0* (GE Healthcare). O ensaio de exsudação foi realizado em triplicata e em duas repetições.

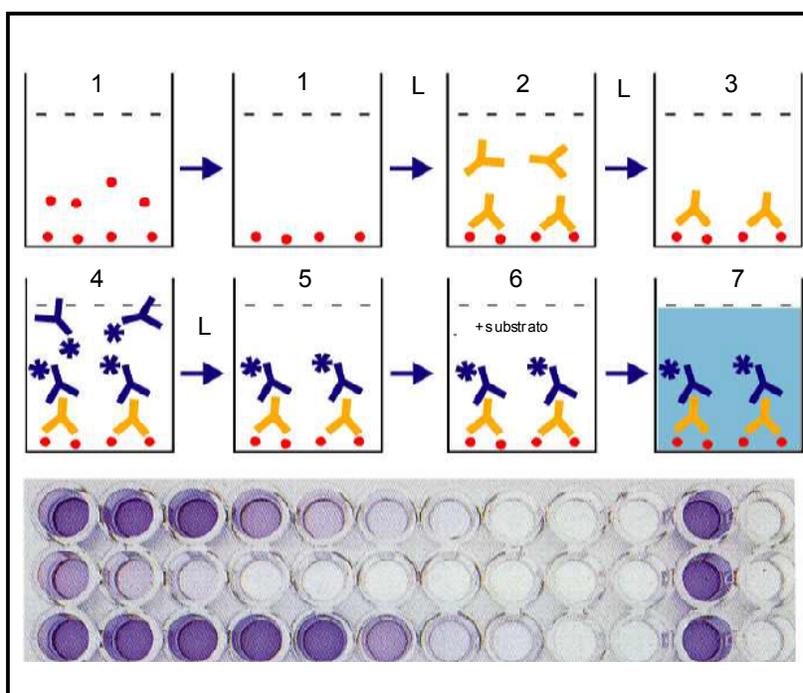
4.3.4.1 Análise do Exsudato de Sementes por Eletroforese Bidimensional

O exsudado de sementes de soja foi também analisado por eletroforese bidimensional. Definido o pico de exsudação de proteínas, amostras de 1 mL do exsudato foram dialisadas exaustivamente contra água Milli[®] Q, liofilizadas e solubilizadas em tampão de re-hidratação composto por uréia 8 M, 7 mg de DTT, CHAPS 2%, azul de bromofenol e 2% de IPG Buffer (pH 3-10; GE Healthcare) de modo a conter cerca de 200 μ g de proteínas em 200 μ L de tampão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 5 minutos e aplicadas em tiras (*strips*) de 11 cm com variação de pH de 3 a 10, sendo deixadas em repouso *overnight* (aproximadamente 12 h). A focalização isoeétrica foi executada de acordo com os parâmetros descritos anteriormente. A separação na segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE (12,5%) de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis foram corados com Coomassie Coloidal (WANG; LI e LI, 2007), digitalizados (*LabScan software*) e analisados utilizando o programa *Image Master TM 2D Platinum v. 7.0* (GE Healthcare).

4.3.4.2 Imunodeteção de SYTX-2

A determinação quantitativa de SYTX-2 nos exsudatos obtidos em diferentes intervalos de tempo foi efetuada com o uso da técnica de ELISA indireto (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) descrita por ROWHANI e FALK (1995). Os exsudatos foram diluídos em tampão de acoplamento (fosfato de sódio 10 mM, fosfato de potássio 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 contendo Tween 20 0,05% v/v -

PBST) de modo a ajustar suas concentrações finais para 25 µgP/mL e as demais etapas do protocolo utilizado foram conduzidas tal como mostrado na **Figura 03**. Como controle negativo, soro pré-imune diluído 1:1000 (v/v), em tampão PBST foi utilizado. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra experimental utilizada e a concentração de SYTX-2 foi estimada a partir de uma curva padrão obtida com amostras de SYTX-2 nas concentrações de 5 a 30 µg/mL.



Legenda:

1 – Impregnação com 100 µL do antígeno – 16 h, 4 °C;

L - Lavagem com tampão PBST sob leve agitação seguida de uma nova lavagem realizada com tampão PBST contendo 5 % de leite em pó desnatado (60 min.).

2 – Retirada do tampão de lavagem e adição de 100 µL do anticorpo primário anti-SYTX-2 (diluído 1:1000 em PBST) - incubado por 1 h a 37 °C.

L e 3 - Lavagem com PBST 4x10 min.

4 – Incubação com 100 µL de anticorpo secundário (1 h a 37 °C) (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina) diluído 1:1000 em PBST.

L e (5) - Lavagem com PBST 4x10 min.

6 e 7 – Adição (6) de 100 µL da solução de revelação contendo p-Nitrofenil Fosfato (pNPP) dissolvido em água Milli-Q®. A reação foi parada com a adição (7) de 40 µL de NaOH 3 N e as leituras foram realizadas a 405 nm em leitor de ELISA (BIO-TEK ELX 800).

Figura 03. Etapas do protocolo experimental de ELISA, usadas para detecção e quantificação da SYTX-2.

4.3.5 Obtenção de Plantas Jovens e Adultas de Soja e Produção dos Extratos Protéicos de Raízes, Caules e Folhas

O plantio de soja foi realizado na casa de vegetação do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (Cenargen – EMBRAPA- Brasília), mantida em temperatura de 25-28 °C e umidade atmosférica variável de 75 a 85%. As sementes foram plantadas em vasos plásticos contendo, aproximadamente, quatro litros de solo, sendo colocadas seis sementes por vaso e deixando-se apenas três plantas por vaso após o desbaste (**Figura 04**). Para os experimentos de imunodeteção de SYTX-2 em diferentes partes de plantas jovens foram obtidas de espécimes no estágio V4 (cerca de 20 dias após o plantio) e de espécimes com 45 dias após o plantio (adultas em estágio R5). A cultivar BRS-Pala, usada para purificação de SYTX-2 e, também, para o plantio apresenta ciclo reprodutivo de 135 dias considerando o fim do ciclo como a produção de sementes maduras. Em casa de vegetação (conforme será mostrado adiante), a produção de flores e sementes é iniciada após 37 dias do plantio.

Raízes, caules e folhas de plantas jovens e adultas foram coletados em nitrogênio líquido, macerados e utilizados para obtenção dos extratos protéicos. As coletas foram realizadas a partir de três plantas de cada vaso, sendo consideradas como uma unidade experimental. Para a quantificação de SYTX-2 nos tecidos vegetais foram consideradas três unidades experimentais. Os extratos protéicos foram obtidos a partir de quantidades iguais de material vegetal maceradas em nitrogênio líquido. As farinhas de raízes, caules e folhas foram colocadas em contato com Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, 50 mM DTT, 10 mM de EDTA, 1mM de PMSF e 2,5 µM de pepstatina A na proporção 1:7 (p/v; volume mínimo para agitação) para tecidos jovens e 1:13 (p/v; volume mínimo para agitação) de tecidos adultos, a 4 °C, durante quatro horas e meia de agitação. As suspensões foram centrifugadas (13.000 x g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante utilizado para análise eletroforética (20 µg de proteínas aplicadas/poço) em gel de poliacrilamida 15% (LAEMMLI, 1970) e imunodeteção de SYTX-2. O restante do extrato foi alíquotado e armazenado a – 20 °C até o uso.



Figura 04. Plantas de soja (cultivar BRS - Pala) em casa de vegetação (Cenargen - Embrapa). Em “A” plantas em diferentes intervalos de tempo após o plantio. Em “B” e “C” detalhe das plantas nos estágios V4 (20 DAP) e 45 dias após o plantio (R5), respectivamente, usadas para detecção de SYTX-2.

4.3.5.1 Detecção e Quantificação de SYTX-2 Através do Ensaio de ELISA

As determinações quali e quantitativa de SYTX-2 em diferentes partes das plantas de soja foram efetuadas com o uso da técnica de ELISA indireto (ROWHANI e FALK, 1995). Os extratos de raízes, caules e folhas de plantas jovens e adultas foram diluídos em tampão PBST, pH 7,4 contendo Tween 20 0,05% (v/v) de modo a ajustar suas concentrações finais para 25 µgP/mL. As demais etapas do protocolo utilizado foram conduzidas tal como mostrado anteriormente. Os dados referentes aos níveis de SYTX-2 presentes nas partes vegetativas das plantas foram expressos em relação ao teor total de proteínas extraídas de cada órgão e, também, em relação à massa de tecido utilizada no processo de extração. Os níveis também foram comparados àqueles obtidos para as sementes.

4.3.6 Indução da Expressão da Soyatoxina-2 em Plantas Adultas Submetidas à Injúria Mecânica

Com o objetivo de avaliar a possível indução de SYTX-2, em plantas adultas submetidas à injúria mecânica, foram utilizadas plantas no estágio R5, provenientes do plantio com sementes de BRS-Pala, tal como descrito anteriormente. O protocolo experimental foi conduzido de acordo com o descrito por MASON e MULLET (1990), com modificações.

Neste experimento, as plantas em estágio R5 foram separadas em unidades experimentais, sendo uma unidade experimental composta por nove espécimes diferentes. O grupo controle (testemunha) foi composto por plantas não injuriadas mecanicamente e o grupo experimental foi composto por plantas injuriadas. A injúria foi realizada através de corte, com lâmina de bisturi estéril, de cerca de 2 cm na extremidade das folhas de 8 trifólios, dos 16 presentes nas plantas (**Figura 05**). Logo após a injúria, as folhas dos trifólios lesionados de três plantas, e de 8 trifólios não lesionados do grupo testemunha (T 0 h) também de 3 plantas foram removidas. Seis horas após a injúria (T 6 h) foram removidos 8 trifólios lesionados do grupo experimental (de mais três plantas) e também 8 trifólios não lesionados da mesma planta injuriada para avaliar se a possível

indução de proteínas era de natureza sistêmica. Nesse mesmo intervalo de tempo, também foram coletadas folhas dos trifólios do grupo testemunha. Vinte e quatro horas (T 24 h) após a injúria, as três últimas plantas da unidade experimental tiveram suas folhas coletadas tal como descrito para o grupo T 6 h. As folhas foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido e quantidades iguais de tecido utilizadas para extração de proteínas e ensaios de detecção imunológica seguindo todas as etapas experimentais descritas anteriormente no protocolo de quantificação de SYTX-2 em raízes, caules e folhas adultos. Com o objetivo de verificar possível modificação nos níveis e perfis protéicos após injúria, amostras de 20 µg de proteínas de cada extrato (T 0 h, T 6 h e T 24 h) foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida 15% (LAEMMLI, 1970), sendo as bandas protéicas coradas com Coomassie Coloidal (WANG, LI e LI, 2007). Os níveis de SYTX-2 detectados em cada grupo foram expressos em função da quantidade de proteínas extraídas e, também, em relação à massa de tecido usada no processo de extração.

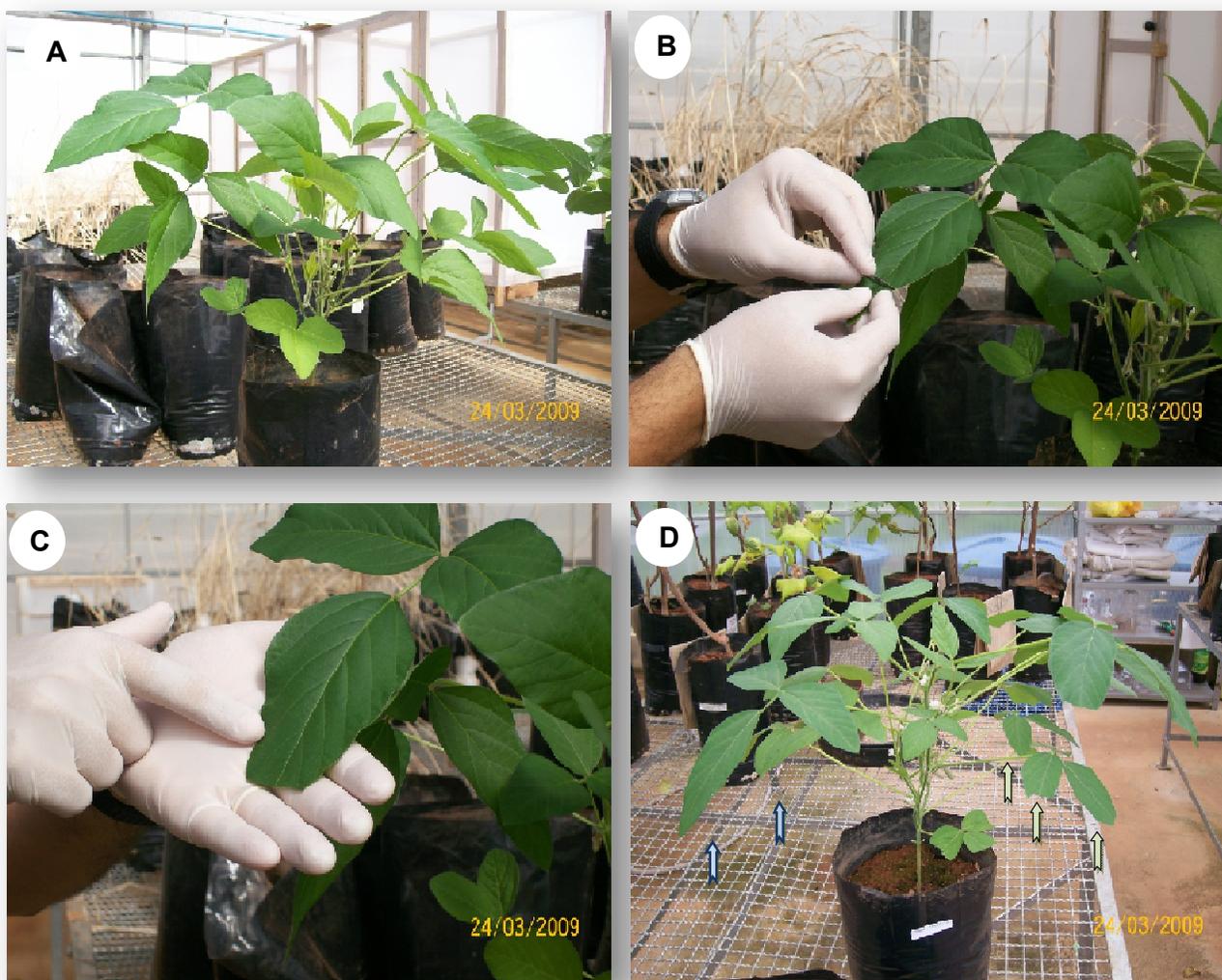


Figura 05. Imagens das plantas de soja utilizadas no experimento de indução por injúria mecânica. Em “A”, plantas adultas no estágio R5, usadas como controles. Em “B” e “C” detalhes do processo de injúria da extremidade das folhas com lâmina de bisturi e das extremidades cortadas de um dos componentes do trifólio. Em “D” visão geral da planta lesionada com destaque para as folhas injuriadas (setas verdes) e não injuriadas (setas azuis) da mesma planta, usadas nos experimentos.

4.4. Espectro de Ação da SYTX-2 Contra Diferentes Espécies de Fungos

Com o objetivo de avaliar a possível atividade antifúngica de SYTX-2 contra patógenos de interesse agrícola para a soja, foram utilizadas espécies de fungos capazes de infectar diferentes órgãos e/ou estádios vegetativos da planta. O efeito sobre a germinação de esporos foi avaliado seguindo a metodologia descrita por Ji e Kúc (1996), adaptada para uso de placas de polietileno reticuladas. Uma alíquota de 10 µL de uma suspensão de esporos (2×10^6 esporos/mL), provenientes de: *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Phomopsis* sp. ou *Rhizoctonia solani* foi incubada com 10 µL de uma solução de SYTX-2 (solubilizada em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5) nas concentrações de 150 e 200 µg/mL. Em seguida, as placas foram mantidas a 37 °C, por 12 horas, em umidade atmosférica (>75%) mantida por meio de papéis de filtro embebidos com água e na ausência total de luz. Após o tempo necessário para a germinação de esporos de cada espécie, as placas foram levadas ao microscópio óptico (Olympus® System Microscope) para análise dos esporos germinados. Alternativamente, ao invés da adição da toxina foram adicionados água Milli®-Q estéril ou peróxido de hidrogênio 100 mM (controles). Como parâmetro experimental, os esporos que apresentaram tubo germinativo equivalente a, pelo menos, duas vezes o diâmetro do esporo foram considerados germinados. As soluções de toxina, tampão e água Milli®-Q estéril usadas nos experimentos foram filtradas em filtro Millex® GV (0,22 µm) antes de serem incubadas com os esporos.

Além dos fungos fitopatogênicos testados, a atividade antifúngica de SYTX-2 foi também avaliada através do ensaio de inibição de crescimento de fungos leveduriformes. *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram utilizados como microorganismos teste. As cepas foram mantidas em meio Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD), sendo utilizados para ensaios repiques de 24 horas em ASD, incubados a 37 °C. O efeito da SYTX-2 sobre o crescimento das leveduras foi avaliado incubando-se 100 µL de uma solução de SYTX-2 em três diferentes concentrações 73,5 µgP/mL, 36,8 µgP/mL ou 18,4 µgP/mL, preparadas em água Milli®-Q, juntamente com 100 µL de uma suspensão das células, cuja turbidez foi ajustada através de absorbância a 620 nm, de modo a corresponder a 1×10^4 células/mL em meio líquido BHI – *Brain Heart Infusion*. As placas foram, então,

incubadas a 37 °C e o crescimento avaliado através de leitura da densidade óptica a 620 nm, em leitor de microplacas (ELISA), a intervalos de 6 horas, durante 36 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando formaldeído 0,4% como controle positivo.

4.5. Atividade nematicida da SYTX-2 contra formas juvenis (J2) de *Meloidogyne incognita*

4.5.1 Obtenção de massas de ovos de formas juvenis do segundo estágio de *M. incognita*

Os ovos de *M. incognita*, Raça 4, foram obtidos a partir de raízes de plantas de tomate, infectadas cerca de 60 dias antes do ensaio biológico e mantidas em casa de vegetação. Após a coleta, as raízes foram cuidadosamente lavadas com água da torneira para retirada de porções de solo ainda aderidas na mesma e, em seguida, lavadas com água destilada, antes da retirada das massas de ovos. As massas foram obtidas por meio de sua retirada manual das raízes com o uso de seringas, agulhas e lupa estereoscópica, sendo colocadas em tubos tipo *ependorf* contendo água destilada estéril, a 10 °C. Após a retirada, as massas de ovos foram colocadas sobre uma tela composta por tecido de espessura fina e depositadas em uma placa de Petri de cerca de 13 cm de diâmetro, contendo 5 mL de água destilada autoclavada (121 °C, $9,806 \times 10^4$ Pascal, 30 minutos). As placas foram acondicionadas em recipiente plástico fechado, contendo papel de filtro umidificado com água e mantido em temperatura ambiente de 25 °C, na ausência de luz. Os J2 eclodidos migravam através da malha de tecido, sendo coletados na placa de Petri. Para os ensaios experimentais, J2 eclodidos entre 24 e 72 horas foram usados, os quais foram retirados da placa de Petri com o auxílio de uma micropipeta. A população de J2 (número de J2/ 10 µL) foi estimada com o auxílio de lâmina e lupa estereoscópica.

4.5.2 Ensaio de atividade nematicida

O ensaio de atividade nematicida da SYTX-2 sobre juvenis de *M. incognita* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por COIMBRA e CAMPOS (2005) com modificações. Aliquotas de 50 µL de uma suspensão contendo, em média, 55 juvenis (J2) foram colocadas em poços de placas de Kline e, em seguida, amostras de 150 µL de SYTX-2 0,5 mg/mL ou 5,3 mg/mL solubilizadas em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 foram adicionadas de modo a perfazer 200 µL de volume final de ensaio e, no grupo experimental, conter 1 ou 11 µgP/ J2. As placas foram mantidas em umidade elevada, à temperatura ambiente de 25 °C e na ausência de luz. Água estéril ou Tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 foram utilizados como controles. Os nematóides foram observados nos tempos 0 h, 6h e 24 h após incubação com a proteína, sendo contados: o número de nematóides vivos – J2 com intenso movimento; imóveis – J2 sem movimento, mas capazes de se movimentar ao serem tocados com agulha; e mortos – J2 imóveis e sem movimentação, mesmo após serem tocados com agulha. Os dados obtidos foram convertidos em valores percentuais e comparados aos grupos controles. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação e Caracterização Físico-Química da Soyatoxina-2

Trabalhos experimentais realizados em nosso laboratório (MAIA, 2008; MORAIS, 2007; SOUSA, 2006 e SIEBRA, 2004) demonstraram que a toxicidade atribuída a extratos protéicos de soja em camundongos é uma característica amplamente distribuída nas cultivares fornecidas pela EMBRAPA e destinadas ao plantio em condições de campo. Essa toxicidade se dá em função da presença de proteínas tóxicas (SYTX – Vasconcelos *et al.*, 1994; SYTX-2 – Sousa, 2006 e SBTX – Vasconcelos *et al.*, 2008) que exercem seus efeitos induzindo convulsões tônico-clônicas seguidas de morte após injeção na cavidade peritoneal de camundongos ou ainda pela via endovenosa. Entretanto, embora diferentes cultivares possam apresentar atividade tóxica como característica comum, os teores de toxinas presentes nessas sementes são diferenciados. Mesmo assim, esse fato demonstra que a presença dessas proteínas em sementes parece denotar alguma função importante para o vegetal, ainda não totalmente esclarecida, embora algumas evidências experimentais apontem, fortemente, para a função de defesa contra pragas e patógenos.

Este tópico descreve a purificação e caracterização físico-química da Soyatoxina-2, através de ensaios adicionais àqueles realizados por Sousa (2006), contribuindo para um melhor entendimento dos aspectos estruturais e funcionais dessa proteína em plantas de soja.

A purificação de SYTX-2 foi efetuada tal como descrito anteriormente, partindo-se de farinha de sementes delipídada como fonte de proteínas. As sementes utilizadas nos protocolos foram provenientes da cultivar BRS-Pala, a qual, segundo a Embrapa, apresenta elevado potencial produtivo (de 3.072 – 3.718 kg/ha) e resistência a diversas doenças como mancha olho-de-rã, cancro da haste, mosaico comum e susceptibilidade a nematóides de galha. A obtenção de SYTX-2 pura representa uma etapa preliminar em sua caracterização estrutural e funcional.

A purificação de SYTX-2 a partir dos extratos protéicos de BRS-Pala obtidos foi conseguida seguindo o protocolo básico descrito por Sousa (2006). Entretanto, com o objetivo de aumentar o rendimento protéico obtido ao final do processo de purificação, os inibidores de protease PMSF 0,1 mM e pepstatina A 1 μ M foram adicionados à etapa de extração de proteínas. A **Figura 06** mostra o perfil cromatográfico obtido em coluna de DEAE-Celulose após aplicação de gradiente salino (NaCl 0,15 a 0,7 M) para eluição de SYTX-2. As frações tóxicas contendo SYTX-2 foram obtidas na região do gradiente salino compreendida entre 0,48 – 0,60 M de NaCl, apresentando rendimento protéico, em massa, de $54,15 \pm 1,62$ mgP. Na ausência de PMSF e pepstatina ao extrato total, o rendimento protéico observado nessa etapa foi de $42,68 \pm 3,66$ mgP, mostrando que os inibidores de proteases foram essenciais na obtenção de maiores quantidades de toxina.

Com o objetivo de remover inibidores de tripsina contaminantes das amostras provenientes da cromatografia de troca iônica, as frações tóxicas eluídas da coluna de DEAE-Celulose foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de Anidrotripsina-Sepharose 4B. A **Figura 07** mostra o perfil cromatográfico obtido em coluna de afinidade, o qual apresenta um pico (SI) dotado de atividade tóxica e destituído de atividade inibitória de tripsina e um segundo pico (SII) protéico contendo o inibidor de tripsina da soja (tipo Kunitz). Os passos cromatográficos mostrados forneceram um material puro e homogêneo, com massa molecular aparente de 28 kDa, utilizado nas etapas posteriores de caracterização físico-química.

A partir da obtenção das massas protéicas ao longo do processo de purificação foi possível calcular os rendimentos (em percentual) de cada etapa do processo de purificação, bem como estimar o teor de toxina apresentado por semente e por grama de tecido, dentro das condições experimentais utilizadas. Ao final do processo de purificação, foram obtidos $40,87 \pm 0,42$ mgP de SYTX-2 pura em cada 50 g de farinha delipídada usada na extração. Os dados referentes ao rendimento e teores de SYTX-2 por semente estão sumarizados na **Tabela 01**.

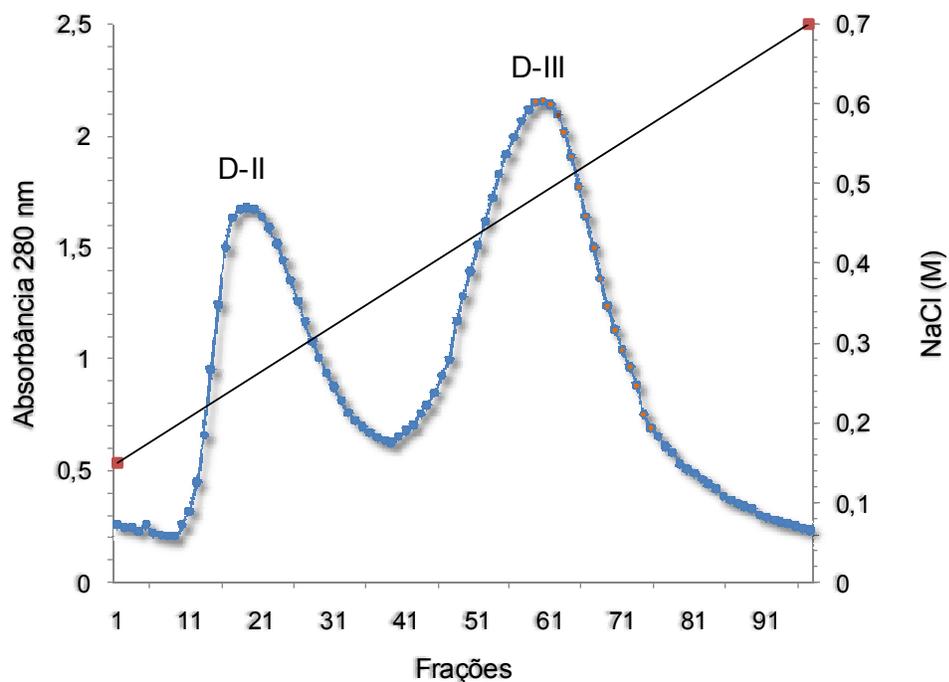


Figura 06. Perfil cromatográfico obtido após aplicação de gradiente salino (NaCl) em matriz de DEAE-Celulose. PREP. A (0,7 gP /10 mL) contendo DTT 5 mM foi aplicado em matriz (15 x 2,8 cm) de DEAE-Celulose equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. D - II e D - III representam proteínas eluídas após aplicação de gradiente salino (0,15 a 0,7 M de NaCl) no tampão de equilíbrio (Fluxo: 35 mL/h; Frações: 3,0 mL/tubo). As frações indicadas em laranja apresentaram toxicidade para camundongos (e.v.).

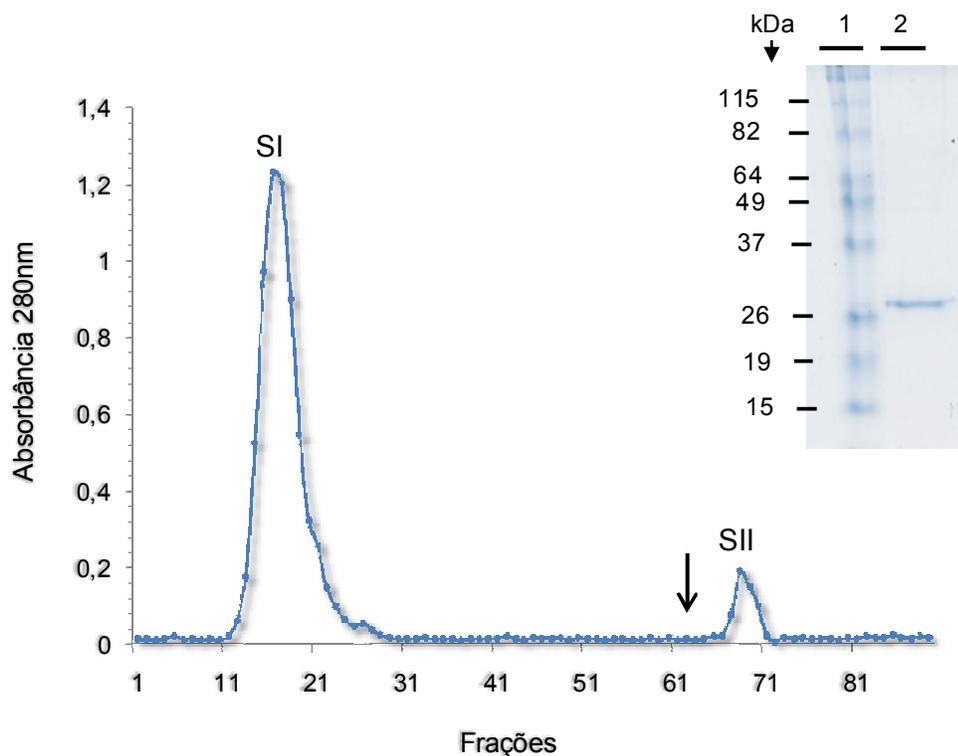


Figura 07. Perfil cromatográfico obtido em coluna de Anidrotripsina-Sepharose® 4B. Frações tóxicas provenientes da cromatografia de troca iônica (15 mgP/5 mL) contendo DTT 5 mM foram aplicadas na matriz de afinidade (18 x 1,6 cm) para a remoção de inibidores de tripsina. A coluna foi equilibrada previamente com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 contendo NaCl 0,15 M, o qual também foi usado para eluição das proteínas não retidas (S – I). Para remoção do material retido contendo SBTI (S – II) foi aplicado (seta) tampão Glicina – HCl 50 mM, pH 2,2, contendo NaCl 0,2 M. (Fluxo: 45 mL/h; Frações: 2,0 mL/tubo). As frações referentes ao material não retido foram tóxicas para camundongos (e.v.). **Detalhe:** eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) de amostras de 20 µg de S - I mostrando a SYTX-2 purificada. (1) Marcadores de massa molecular e (2) Material não retido em coluna de afinidade.

Tabela 01. Rendimento em massa da SYTX-2 em relação à massa das sementes de BRS-Pala utilizadas no processo de purificação. Os valores representam a média ± desvio padrão da média de dados obtidos de dez repetições, partindo-se de uma quantidade total de 50 g de farinha delipidada. Com exceção das colunas “Farinha” e “Rendimento total”, os demais valores são mostrados como proteínas totais, calculadas a partir do produto da dosagem de proteínas pelo volume de cada material obtido. (Fundação Pró-sementes Passo Fundo – RS)

ETAPA						
	Farinha (50 g)	Extrato Total Proteínas totais (g)	Fração 20-55% Proteínas totais (g)	Frações tóxicas DEAE (mg)	Frações tóxicas Afinidade (mg)	Rendimento de toxina total (mg/100 g de farinha)
Proteínas (g)	38,8 ^a	11,67 ± 1,04	2,54 ± 0,54	54,15 ± 1,62	40,87 ± 0,42	81,75 ± 0,84
* Rendimento (%)	100	30,5	21,76	2,13	75,47	-

Massa média de 01 semente (cv. BRS-Pala): 0,142 g Em 100 g – 704 sementes

Estimativa do conteúdo total de toxina/ semente: 58,05 µg – 0,04% da massa de uma semente ou 408 µg de toxina/g de tecido.

*Rendimento protéico expresso em relação à etapa anterior do processo de purificação.

^aO teor de proteínas da farinha delipidada foi determinado a partir do percentual protéico das sementes de BRS-Pala – 38,8 g/100 g de sementes (Fonte: Fundação Pró-Sementes).

O material proveniente do processo de purificação da SYTX-2 foi caracterizado, inicialmente, em relação à sua sequência NH₂-terminal. A banda de massa molecular aparente de 28 kDa correspondente à SYTX-2 foi seqüenciada pelo método de degradação de Edman a partir de bandas protéicas transferidas para membrana de PVDF. A proteína apresentou como sequência NH₂-terminal: **KTISSEDSPPFNCREK**. Após o alinhamento dessa extremidade NH₂-terminal com sequências protéicas não redundantes através do algoritmo BLASTp, foi observado que essa proteína apresenta identidade com muitas proteínas (160) presentes em soja, algumas das quais são proteínas de reserva (dbj|BAB64304.1-9/10 - 90%), precursores de peroxidase (gb|AAC98519.1| - 4/4 - 100%) ou de endo beta-1,4-glucanases (gb|ABD62083.1| 6/9 - 66%) dentre outras, não se observando nenhuma classe específica de proteínas que pudesse denotar função biológica atribuída à SYTX-2.

Por eletroforese bidimensional, SYTX-2 se apresentou como dois spots de massas moleculares de 27,356 e 27,271 kDa e pontos isoelétricos ácidos de 5,11 (spot 1) e 5,24 (spot 2), respectivamente (**Figura 08**). A presença de dois spots protéicos denota, em primeira análise, que a SYTX-2 possui duas isoformas de pontos isoelétricos e massas moleculares distintas. Entretanto, o seqüenciamento NH₂-terminal dessa proteína demonstrou a presença de uma única sequência, sugerindo, fortemente, que essas isoformas apresentam o mesmo NH₂-terminal.

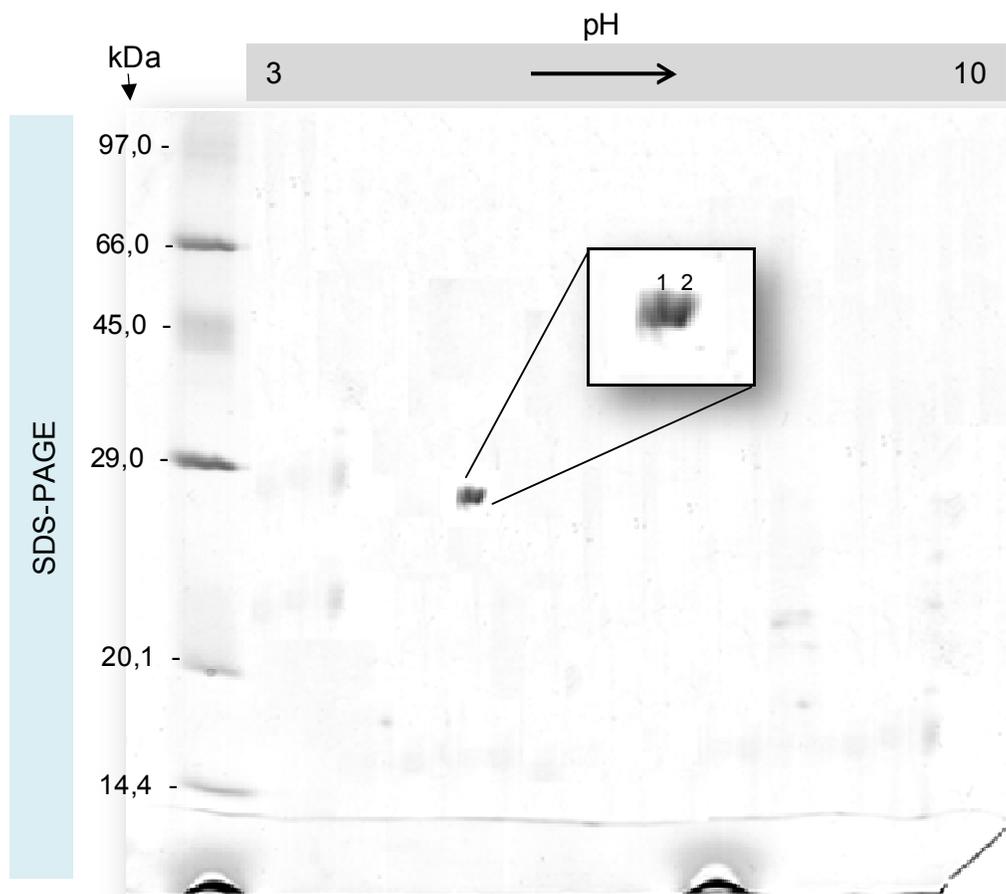


Figura 08. Eletroforese bidimensional da SYTX-2. Os marcadores de massa molecular utilizados estão assinalados à esquerda do gel de poliacrilamida (12,5%). As amostras foram submetidas à focalização isoeétrica em tiras de 11 cm com gradiente de pH 3-10 e os géis foram corados com Coomassie Coloidal.

A fim de investigar a estrutura secundária e estimar a sua estabilidade térmica, a SYTX-2 purificada foi estudada através de espectroscopia de dicroísmo circular (CD). A **Figura 09** (linha azul) mostra o espectro de CD da SYTX-2 em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, condição cuja toxicidade da proteína foi observada. SYTX-2 apresentou um espectro de CD caracterizado por um mínimo de elipticidade molar pronunciado em 210 nm e um máximo positivo observado em 196 nm. Esse espectro é característico de proteínas que apresentam α -hélices e folhas- β em sua estrutura secundária. A desconvolução desse espectro no pH 7,5 permitiu definir os percentuais de estrutura secundária observados para SYTX-2 os quais estão sumarizados na **Tabela 02**, juntamente com os percentuais de estrutura secundária já observados para outras neurotoxinas vegetais.

A estabilidade estrutural da SYTX-2 frente às várias temperaturas testadas também foi determinada no intervalo de temperaturas de 25 a 95 °C (**Figura 09**). Os dados obtidos mostram que com o aumento gradual de temperatura ocorrem perdas na elipticidade molar, observada em relação à proteína nativa, o que representa, provavelmente, a diminuição de elementos de estrutura secundária. Em 95 °C, a proteína provavelmente se tornou desenovelada ou desnaturada caracterizada pelo espectro típico de estruturas não ordenadas.

A partir dos estudos de estabilidade da estrutura secundária de SYTX-2 frente a diferentes temperaturas, foi possível traçar, graficamente, as frações de proteínas desnaturadas em função da temperatura e definir a temperatura média de desnaturação da molécula, que apresenta o valor de $49,0 \pm 0,6$ °C, tal como mostrado na **Figura 10**.

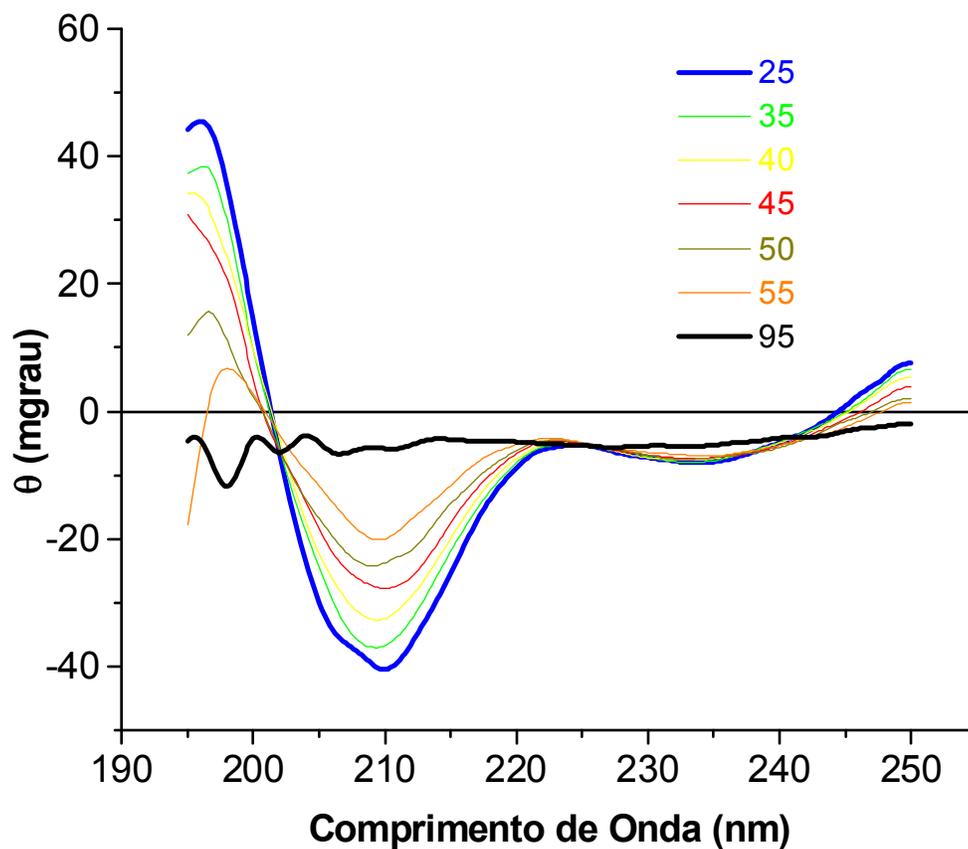


Figura 09. Estudos da estabilidade térmica da SYTX-2 monitorada por dicroísmo circular. A toxina (0,5 mg/mL), dissolvida em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e incubada de 25 a 95°. Em cada temperatura, a proteína foi incubada por 10 min antes das medidas de CD. Na figura, foram omitidos alguns espectros para que os dados pudessem ser melhor visualizados.

Tabela 02. Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes na SYTX-2, determinados a partir do espectro de dicroísmo circular. Os valores são apresentados em percentual do conteúdo de estrutura secundária em pH 7,5 e comparados com padrões de estrutura já definidos para toxina da soja (SBTX), também isolada a partir das sementes de soja (VASCONCELOS *et al.*, 2008) e para a Canatoxina (CNTX), isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*

Proteína	α – hélice (%)	Folha – β (%)	Voltas (%)	Estrutura não ordenada	Referência
SYTX-2	36,3	19,9	18,5	25,3	Esta tese
SBTX	35	13	27	25	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2008
CNTX	27	22	ND	ND	CARLINI, 2007

*As proteínas usadas para comparação apresentam atividade neurotóxica com sinais clínicos semelhantes àqueles descritos para a SYTX-2. ND- Não determinado.

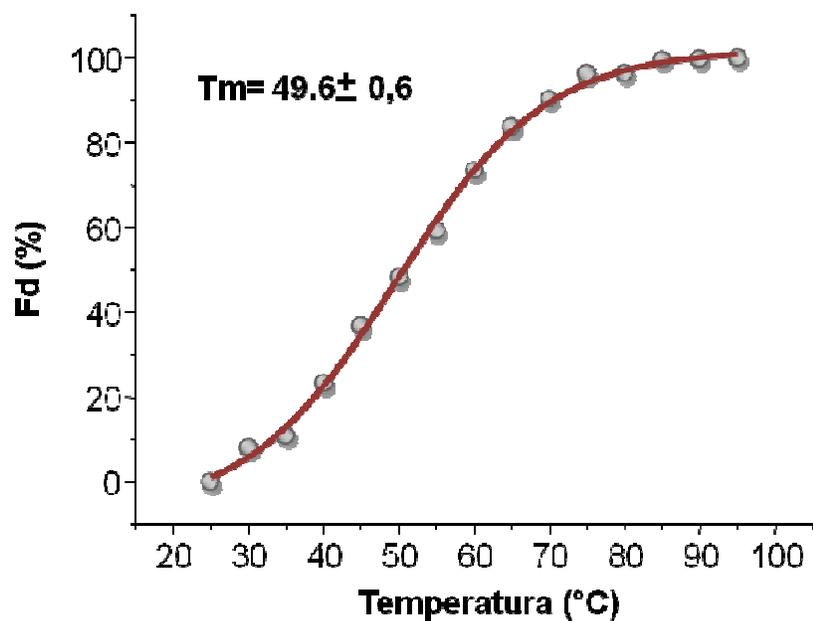


Figura 10. Temperatura média de desnaturation da SYTX-2 em pH 7,5. Os pontos do gráfico são referentes às medidas de dicroísmo circular a 210 nm da toxina em temperaturas de 25 a 95 °C. Fd - Fração de proteína desnaturada.

Um dado interessante (**Figura 11**) proveniente dos estudos através de CD mostra que, embora com o aumento de temperatura a SYTX -2 apresente perdas na estrutura secundária, caracterizada por perda no mínimo e máximo de elipticidade molar observada na estrutura nativa, quando a proteína é gradativamente submetida a temperaturas mais baixas, a partir de seu ponto de desnaturação (95 °C), ocorre recuperação (*refolding*) dos padrões de estrutura secundária da proteína nativa com quase 100% de retorno às condições de estrutura secundária nativa.

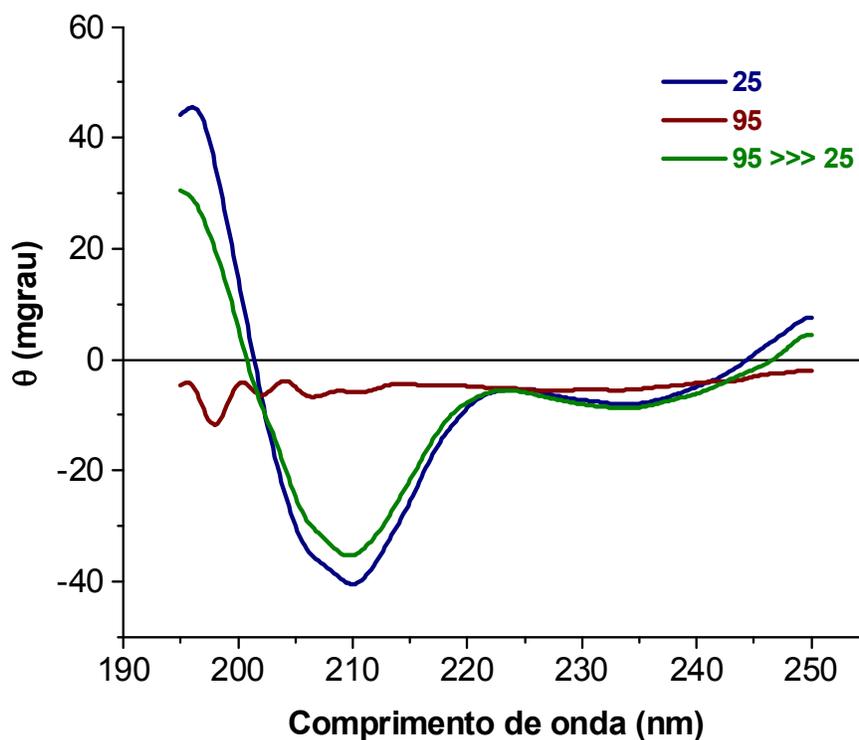


Figura 11. Espectro de dicroísmo circular da SYTX - 2 (0,5 mg/mL) em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, mostrando a toxina nativa (em azul – 25 °C), desnaturada (vermelho - 95 °C) e reenovelada (verde) após incubação a 25 °C por 30 min.

A integridade estrutural da SYTX-2 também foi avaliada através de espectroscopia de emissão de fluorescência. Os resíduos de triptofano presentes nas proteínas atuam como sondas espectrais para a estrutura terciária. Os máximos de emissão de fluorescência em 323 nm para proteínas excitadas em 280 nm e de 333 para proteínas excitadas em 295 nm, obtidos para SYTX-2, são característicos de resíduos de triptofano internalizados na proteína (**Figura 12 A e B**).

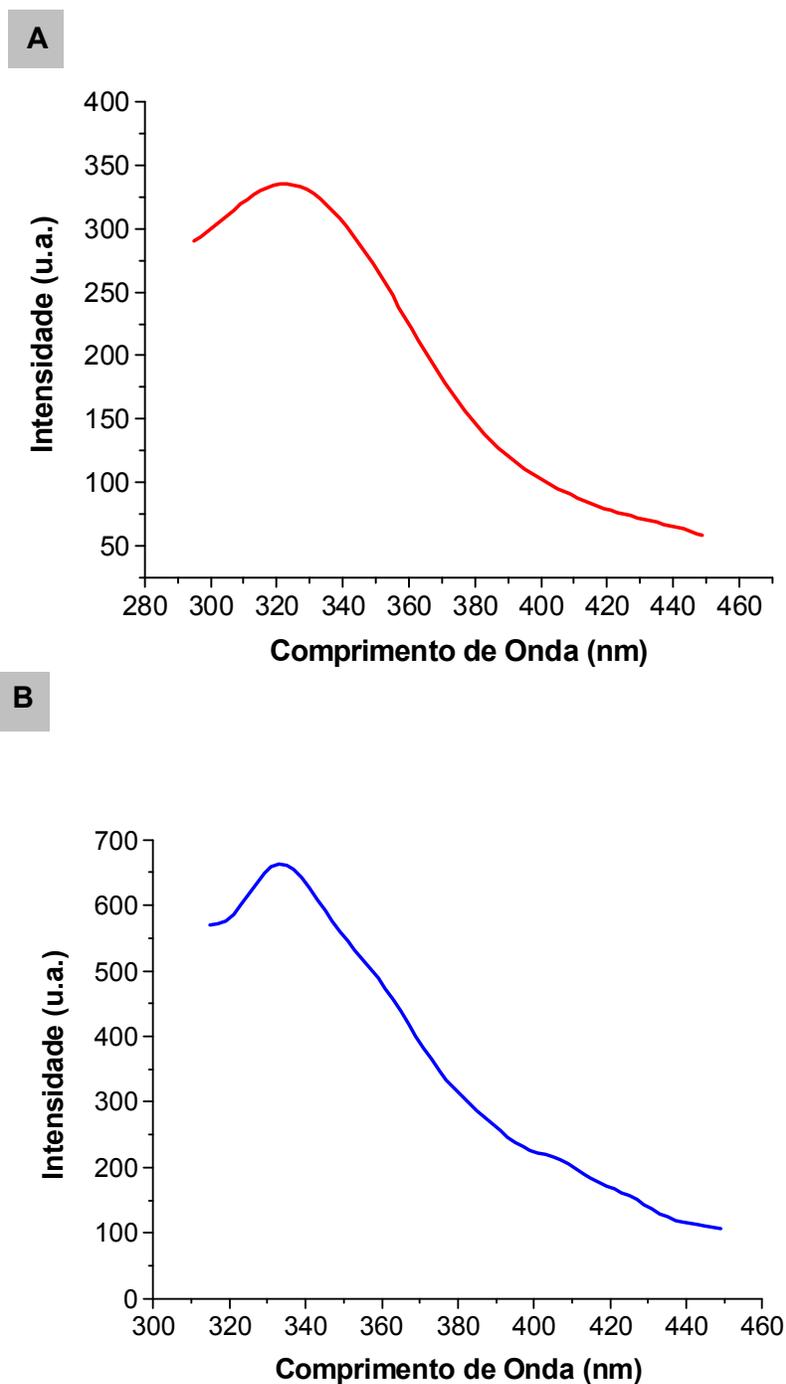


Figura 12. Espectro de fluorescência da SYTX-2. As amostras protéicas (0,5 mg/mL) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e submetidas às análises em espectrofotômetro Perkin-Elmer utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. **(A)** Amostra excitada a 280 nm – máximo de 323 nm; **(B)** Excitada a 295 nm – máximo de 333 nm.

De acordo com Sousa (2006), SYTX-2 apresenta atividade tóxica como sua característica principal, sendo uma molécula destituída de atividade inibitória de tripsina, ureásica e hemaglutinante direta. Entretanto, através de ensaios *in vitro* (realizados nesta tese) foi determinado que SYTX-2 apresenta atividade ribonucleásica, sendo capaz de hidrolisar moléculas de RNA, numa taxa de $1821,42 \pm 3,34 \text{ UA. h}^{-1} \text{ mgP}$. As amostras de SYTX-2 (0,35 mgP/mL) foram solubilizadas em Tris-Cl 20 mM. Em presença de Tris-HCl não houve hidrólise significativa de RNA. Essa atividade é relativamente estável na temperatura de 40 °C e é mantida por um intervalo de tempo superior a 20 h.

Embora SYTX-2 não tenha demonstrado atividade hemaglutinante direta, não sendo, portanto uma hololectina, o ensaio de hemaglutinação indireta mostrou que essa proteína é capaz de interagir com eritrócitos através de estruturas glicídicas e, conseqüentemente levar à hemaglutinação (**Figura 13 A**). O ensaio experimental foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Carlini (1985).

Quando incubada com diluições seriadas (1:2) de SYTX-2, partindo-se de uma solução de 20 mgP/mL, não houve aglutinação da suspensão de eritrócitos usadas no ensaio. Entretanto, a adição de IgG policlonal anti-SYTX-2 (50 µg/poço) aos eritrócitos incubados previamente com SYTX-2 levou a hemaglutinação 1 h após incubação a 37 °C. O título da atividade observada foi de 2.048 UH/mL e a atividade hemaglutinante específica foi de 120,4 UH/mgP. O controle positivo do ensaio foi realizado com a fração 20-55% usada para obtenção de SYTX-2, ainda apresentando SBA em sua composição. Para a fração, foi detectada uma atividade hemaglutinante de 2.048 UH/mL e uma atividade específica de 31,99 UH/mgP. Não foi observada hemaglutinação quando os eritrócitos foram incubados com os anticorpos utilizados no ensaio.

A inibição da atividade hemaglutinante indireta apresentada pela SYTX-2 também foi estudada incubando-se previamente a toxina em presença de soluções de monossacarídeos 0,1 M (glucose, manose, galactose, *N*-acetil-D-glucosamina e D-fucose) e, também, da glicoproteína mucina (2,5 mg/mL) antes da realização do ensaio. Para todos os grupos experimentais, foram utilizadas 4 UH/ ml da proteína. A **Figura 13 B** mostra que, em presença de glucose, galactose, *N*-acetil-D-glucosamina, fucose e mucina, não houve inibição da

atividade hemaglutinante. Entretanto, D-manose 0,1 M foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante de SYTX-2, mostrando ser a toxina uma proteína capaz de interagir com carboidratos através de um único sítio presente na cadeia polipeptídica.

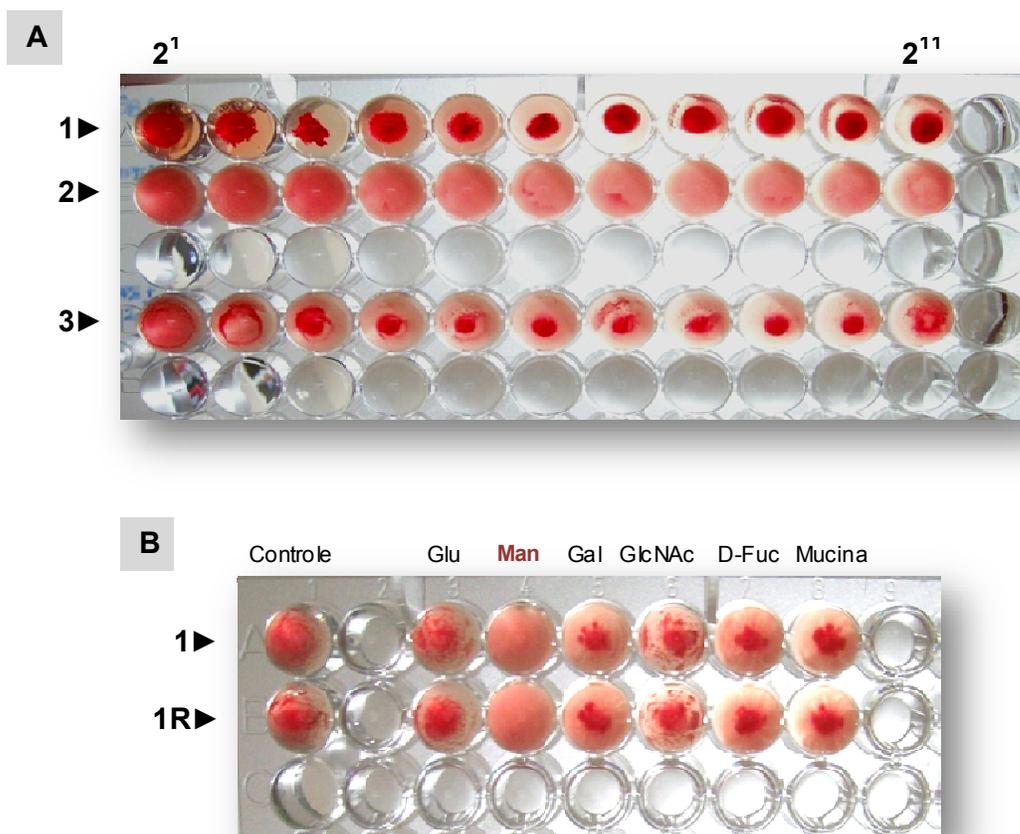


Figura 13. Ensaio de atividade hemaglutinante direta e indireta da SYTX-2 utilizando eritrócitos de coelho (2%). Em “A” são visualizadas a atividade hemaglutinante da fração 20-55% de BRS-Pala (Linha 1), a ausência desse efeito após incubação por 1 h com SYTX-2 à temperatura ambiente (Linha 2) e a atividade hemaglutinante indireta de SYTX-2 após incubação com eritrócitos à temperatura ambiente – Linha 3), seguida da adição de 50 µg de IgG anti-SYTX-2. Em “B” pode ser observada (com repetição 1R) a inibição da atividade hemaglutinante indireta de SYTX-2 pelo monossacarídeo D-manose (0,1 M). As amostras de SYTX-2 (4 UH) foram incubadas com os açúcares (0,1 M) e com a glicoproteína mucina (2,5 mg/mL) por 30 min antes da realização do ensaio.

5.2 Distribuição da SYTX-2 em Sementes de soja

Muitas proteínas vegetais envolvidas nos processos de defesa contra pragas e patógenos apresentam distribuição bastante ampla, várias delas estando presentes em todos os órgãos vegetativos e reprodutivos. Para outras proteínas, a distribuição pode ser restrita, mas níveis elevados de determinadas proteínas histo-específicas podem ser detectados em vários órgãos não submetidos à infecção ou injúria mecânica. Com o objetivo de mapear a distribuição tecidual da SYTX-2 em plantas de soja mantidas em casa de vegetação foram produzidos anticorpos policlonais em coelho, contra a toxina, de forma que essas imunoglobulinas pudessem ser usadas como ferramentas na imunolocalização da SYTX-2.

Como uma etapa prévia, em relação aos experimentos envolvendo imunodeteção, os anticorpos produzidos foram avaliados quanto à sua especificidade e título. A **Figura 14** (parte superior) mostra imagens do ensaio de *Dot Blotting* usado para determinar o título dos anticorpos produzidos. Como pode ser observado, os anticorpos policlonais produzidos contra SYTX-2 foram capazes de reconhecer amostras da proteína imobilizadas em membrana de nitrocelulose nas três diluições utilizadas no ensaio. Em função da resposta obtida, a diluição de 1:1000 foi utilizada nos testes de imunodeteção. A especificidade dos anticorpos obtida também foi avaliada através de *Western Blotting*. Amostras tóxicas e não tóxicas provenientes da cromatografia em DEAE-Celulose foram utilizadas como amostras teste.

A parte inferior da **Figura 14** mostra que, nas diluições de 1:50 e 1:100 os anticorpos reconheceram uma banda única (setas), de massa 28 kDa, que representa a SYTX-2. Entretanto, na diluição de 1:50 os anticorpos também reconheceram duas bandas de massa molecular superior a 64 kDa. As diluições superiores a 1:100 não produziram bandas visíveis de SYTX-2. No soro pré-imune, também não foram detectadas bandas reconhecidas tal como era esperado.

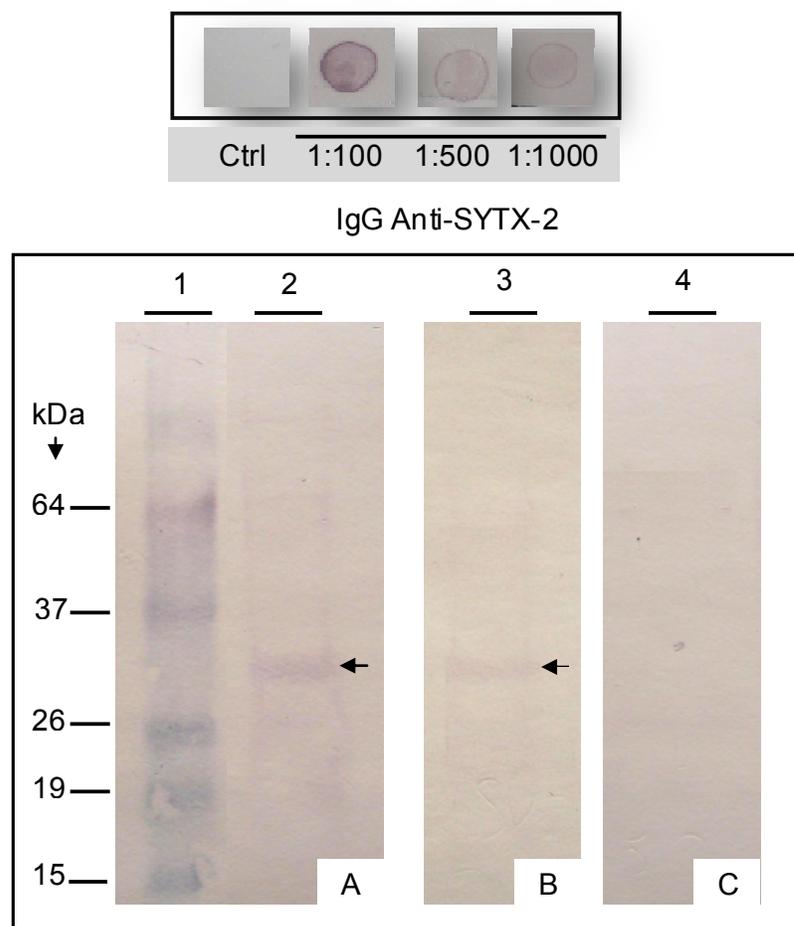


Figura 14. Determinação do título e especificidade dos anticorpos policlonais produzidos contra SYTX-2 em coelhos. Na parte superior, *Dot Blotting* usando os anticorpos nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000 (v/v). Como controle experimental foi utilizado soro pré-imune como fonte de anticorpos primários. Na parte inferior, *Western Blotting* para determinação da especificidade dos anticorpos. Em “A” e “B” os anticorpos foram utilizados nas diluições de 1:50 e 1:100, respectivamente, partindo-se de uma solução de 1 mg/mL. Em “C” é mostrado o resultado da incubação com o soro pré-imune. Raia 1 - marcadores de massa molecular; Raias 2 a 4 foram transferidas proteínas de frações tóxicas e não tóxicas provenientes na cromatografia de troca iônica. Nas diluições de 1:200, 1:500 e 1:1000 (v/v) não foram detectadas bandas reconhecidas pelos anticorpos. O resultado apresentado é semelhante ao obtido usando SYTX-2 pura.

Como passo inicial no mapeamento da SYTX-2 em diversas partes de plantas de soja, a presença da toxina foi investigada nas cascas das sementes. Foram produzidos extratos protéicos a partir da casca das sementes de BRS-Pala, seguindo as condições descritas para extração de proteínas das sementes inteiras. O extrato protéico da casca apresentou um teor de proteínas igual a $2,46 \pm 0,18$ mgP/mL, sendo, pelo menos, 15 vezes menor do que aquele descrito para sementes inteiras que foi de $37,3 \pm 1,85$ mg P/mL. Quando injetado pela via intraperitoneal ou endovenosa, em doses equivalentes a 2,46 mgP/animal, não foi detectada toxicidade em camundongos.

Para o extrato total de sementes de BRS-Pala a DL_{50} observada em camundongos foi de $653 \pm 30,35$ mgP/kg de massa corporal, o que equivale a 13,06 mgP/20 g de camundongo. Considerando os valores observados para sementes inteiras, o extrato da casca foi concentrado de modo a permitir a injeção de uma quantidade de proteína próxima à DL_{50} apresentada para o extrato total. Quando os camundongos receberam a dose de 15,0 mgP do extrato total através da via intraperitoneal, foi detectada mortalidade após 10 h, de todos os camundongos usados no grupo experimental, mostrando que a casca da soja possui atividade tóxica podendo apresentar SBTX e/ou SYTX-2 (**Tabela 03**).

O extrato da casca de sementes de soja também foi analisado por SDS-PAGE, para avaliação da presença banda protéica referente à SYTX-2, sendo também imobilizado (10 µgP) em membrana de nitrocelulose e submetido à detecção imunológica utilizando IgG anti-SYTX-2. A **Figura 15** mostra eletroforese em gel de poliacrilamida do extrato total da casca de *G. max*, indicando (seta) a presença de uma banda de massa aparente de 28 kDa. Utilizando IgG anti-SYTX-2 na diluição de 1:1000 (v/v) também foi possível detectar a presença da toxina, por Dot Blotting.

Tabela 03. Determinação da toxicidade da casca de sementes de soja, em camundongos, pela via intraperitoneal. As sementes de BRS-Pala foram destegumentadas e submetidas ao processo de extração e dosagem de proteínas tal como descrito anteriormente. Para o ensaio de toxicidade com amostras concentradas, o extrato total da casca foi dialisado contra Tris-HCl 2,5 mM e concentrado por liofilização. Para comparação dos teores de toxina, os dados de toxicidade de sementes inteiras (delipidadas) são mostrados

Fonte de proteínas	Massa de tecido (g)	Dosagem de proteínas (mg/mL)	Proteínas administradas (mg/20 g animal)	Letalidade observada
Casca	5	2,46 ± 0,18	2,46	Não
Casca (amostra concentrada)	5	15,1 ± 0,20	15,00	Sim
Sementes inteiras	2	34,25 ± 3,18	14,00	Sim

*Os camundongos utilizados nos ensaios (05/dose) tinham 20 ± 2 g de massa corporal. As doses mostradas para a casca foram as máximas utilizadas nos ensaios. Dose mínima letal para o extrato total de sementes: 9 mgP/20 g de animal.

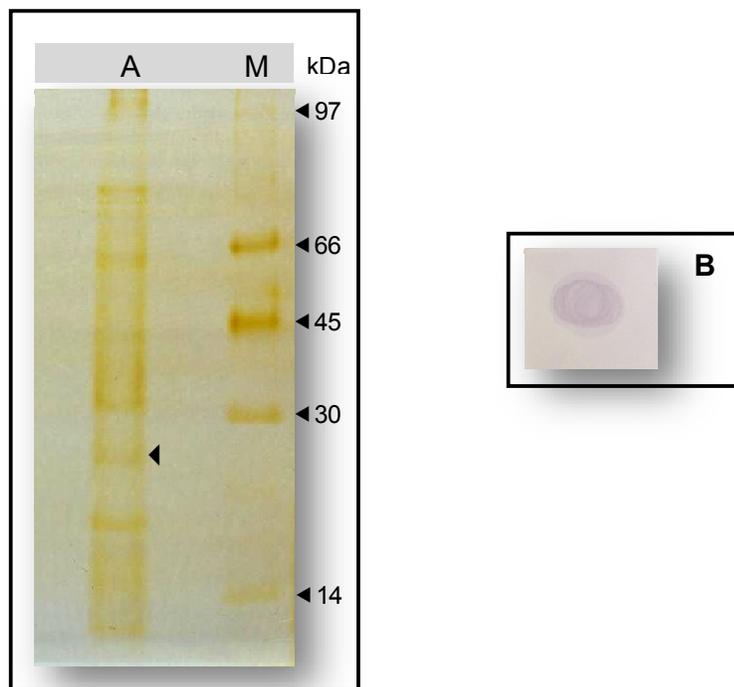


Figura 15. Em “A” eletroforese em gel de poliacrilamida (15%; SDS-PAGE) das proteínas extraídas da casca de sementes de soja. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,125 M, contendo glicerol, SDS e 1% β -mercaptoetanol, sendo aplicados cerca de 20 μ g de proteínas por poço. As massas dos marcadores são mostradas em kDa e o gel foi revelado com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). (\blacktriangleleft) indica proteína de massa molecular aproximada de 28 kDa. **Em “B” Dot Blotting das proteínas da casca.** Os anticorpos anti-SYTX-2 foram utilizados na diluição de 1:1000 (v/v).

5.3 Detecção da SYTX-2 em Exsudados de Sementes de Soja

A **Figura 16** mostra o perfil de exsudação de sementes de soja cv. BRS-Pala ao longo de vinte e quatro horas. Em presença de tampão acetato de sódio, pH 5,0, as sementes de soja exsudaram teores progressivamente maiores de proteínas atingindo um pico de exsudação 18 h após a embebição, quando o nível atingiu uma média de $162 \pm 5,24$ $\mu\text{gP/sememente}$. A exsudação protéica somente se tornou significativa após 6 h em tampão acetato e no intervalo de tempo de 24 h os níveis de proteínas exsudadas foram menores do que aqueles alcançados em 18 h. Em termos percentuais, o teor máximo de proteínas exsudadas chega a 0,2% do teor de proteínas totais da semente.

A **Figura 17** mostra o perfil eletroforético das proteínas exsudadas nos diferentes tempos. As amostras provenientes dos intervalos de coleta do ensaio mostraram o mesmo perfil eletroforético, havendo o predomínio de bandas protéicas com diferentes massas moleculares variando de 110 kDa a menos de 15 kDa. A eletroforese também corrobora com o fato de que em 24 h ocorreu um nível de exsudação protéico menor, visto que, para o mesmo volume de amostra aplicada, tem-se bandas protéicas menos intensas. As setas vermelhas mostradas no gel apontam para uma proteína de massa molecular aparente de 28 kDa cujo aumento progressivo de intensidade de gel também corresponde ao da cinética de exsudação.

Com o objetivo de detectar e quantificar a presença de SYTX-2 nos exsudados de sementes, as amostras dos diferentes intervalos de tempo tiveram suas concentrações ajustadas para 2,5 $\mu\text{gP/mL}$ e foram submetidas à quantificação através da técnica de ELISA, utilizando os anticorpos policlonais produzidos contra a toxina na diluição de 1:1000 (v/v), tal como determinado pelo *Dot Blotting*. Na **Figura 18**, são mostrados os níveis de toxina exsudados pelas sementes de soja ao longo de 24 h. Embora não tenha havido exsudação significativa de proteínas no intervalo de tempo de 1 h, SYTX-2 já é detectada nos exsudados de sementes ($1,87 \pm 0,13$ $\mu\text{gP/sememente}$), havendo aumento nos níveis de toxina exsudada até o pico de 18 h, correspondente a $6,16 \pm 0,08$ $\mu\text{gP/sememente}$ ou 3,18% das proteínas totais exsudadas. O aumento na exsudação de toxina foi descrito anteriormente, quando da presença de uma banda no gel de

massa aparente de 28,3 kDa. Em 24 h, os níveis de SYTX-2 detectados foram de $3,41 \pm 0,65$ $\mu\text{gP}/\text{semente}$, correspondendo a pouco mais de 50% das proteínas exsudadas em 18 h.

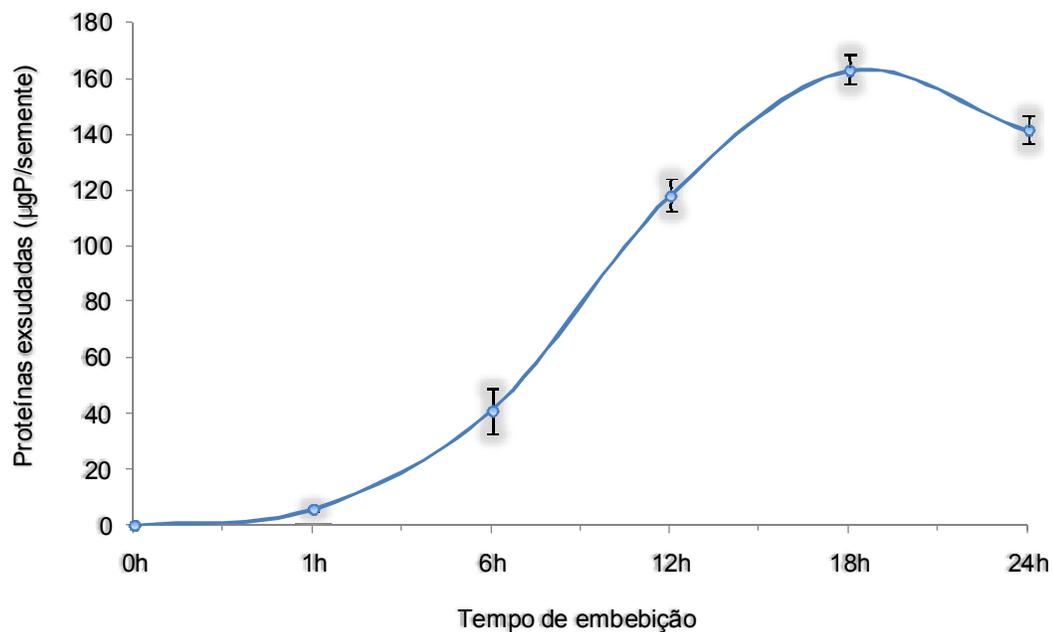


Figura 16. Proteínas exsudadas de sementes de soja ao longo de vinte e quatro horas. Vinte sementes de soja (cv. BRS - Pala) foram colocadas em presença de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, sendo retirado o tampão de embebição a cada intervalo de tempo assinalado no gráfico. A dosagem de proteínas totais foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (1976).

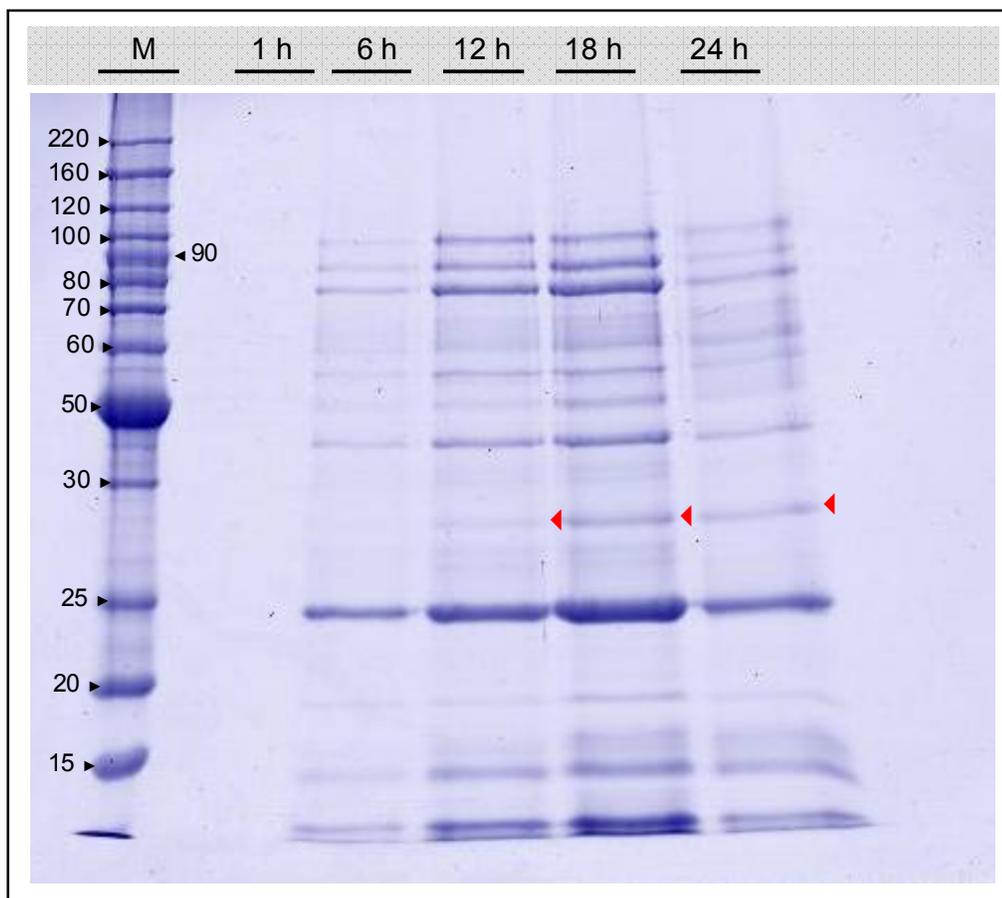


Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) das proteínas exsudadas de sementes de soja. As amostras (20 μ L do exsudados de cada intervalo de tempo) foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,125 M contendo glicerol, SDS e 1% β -mercaptoetanol, sendo aplicados cerca de 20 μ l dos materiais provenientes de exsudados de 1 h – 24 h, identificados nas raias. Como marcador de massa molecular (raia M) foram utilizados 10 μ l de *BenchMark[®] Protein Ladder* (Invitrogen). As massas dos marcadores são mostradas em kDa. (◄) indica proteína de massa molecular de 28 kDa, conforme determinado pela análise do gel utilizando o programa *Image Master* – GE HealthCare.

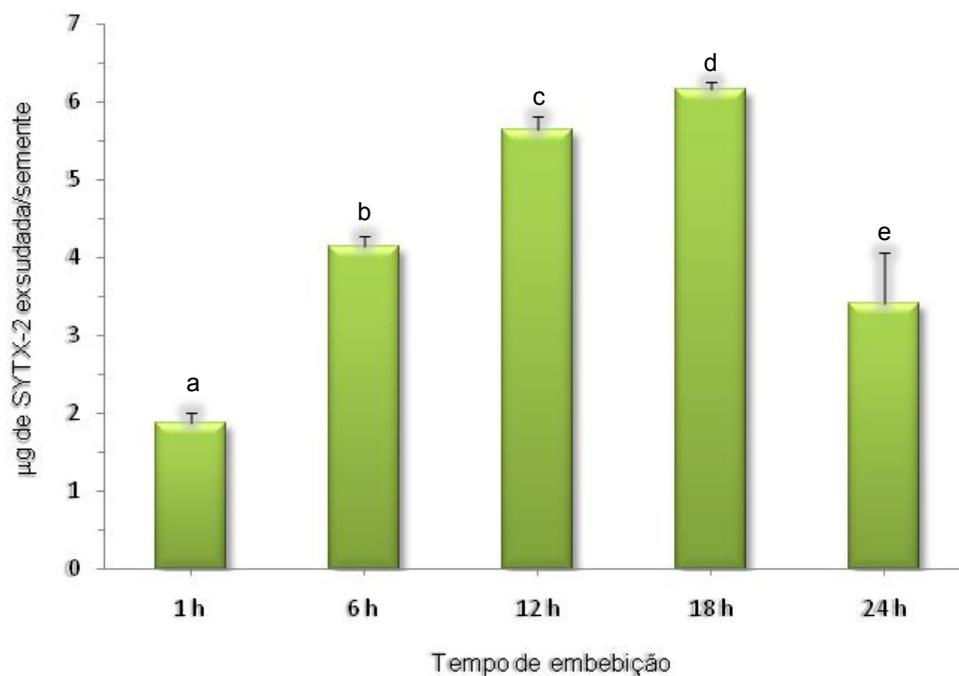


Figura 18. Níveis de SYTX-2 exsudados a partir de sementes de soja ao longo de vinte e quatro horas. A quantificação de SYTX-2 nos exsudatos foi determinada através da técnica de ELISA indireto, usando anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a toxina (diluição 1:1000; v/v). Os ensaios foram realizados em triplicata e em 3 repetições. Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SYTX-2 ($p < 0,05$, Teste de Turkey).

A análise por eletroforese bidimensional das proteínas exsudadas pelas sementes de BRS-Pala (**Figura 19**) mostrou um perfil de exsudação composto em sua maioria por proteínas com ponto isoelétrico na faixa ácida de pH. Ao todo, foram detectados 169 spots, distribuídos da seguinte forma: 51 spots com pI entre 3,0 e 5,0, 40 spots com pI entre 5,0 e 7,0 e 78 spots com pI entre 7,0 e 10,0, com massas moleculares variando de 17,8 a 74,2 kDa. Através da 2-DE, também foi possível encontrar dois spots protéicos (setas) com massas moleculares de 27,3 e 27,2 e pI de 5,12 e 5,23, respectivamente, os quais pertencem à SYTX-2, tal como pode ser visualizado na análise bidimensional da proteína, citada anteriormente.

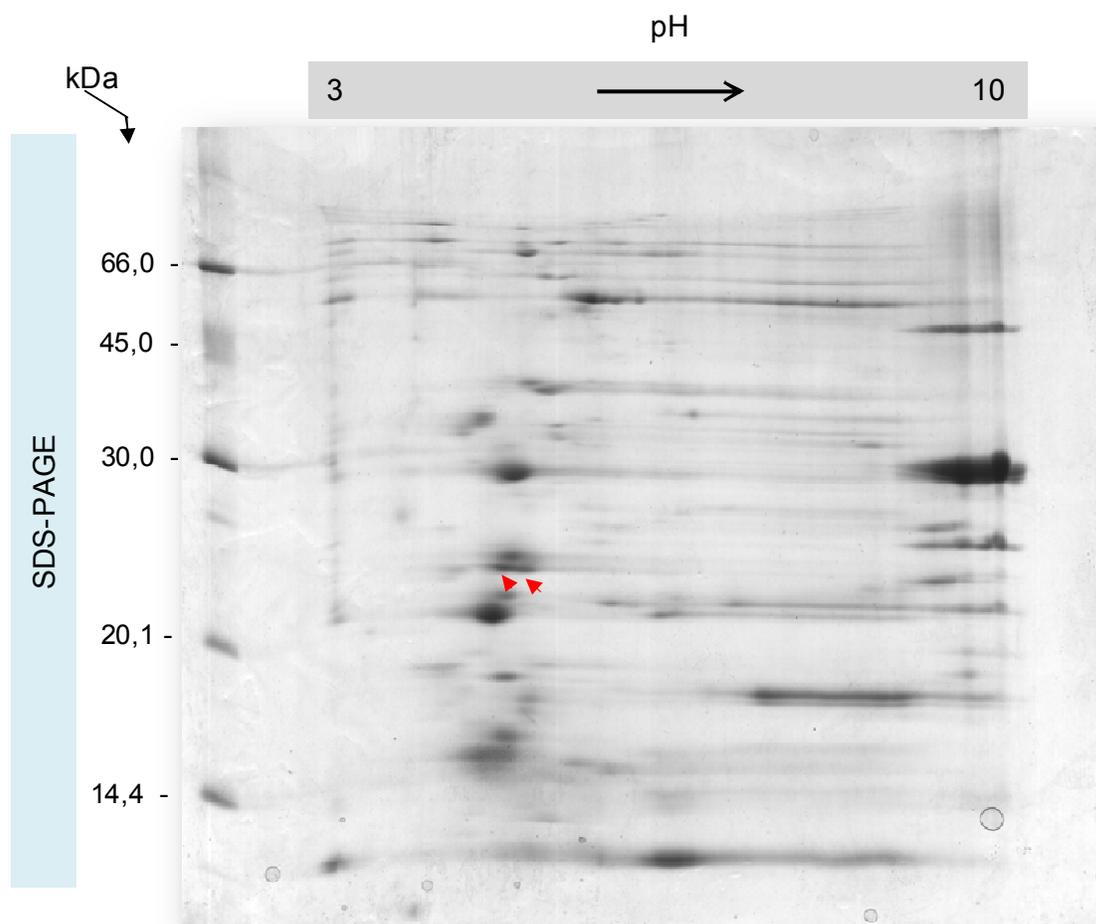


Figura 19. Mapa protéico bidimensional das proteínas exsudadas por sementes de soja. Amostras (200 μg de proteínas) provenientes do pico de exsudação de proteínas (18 h) foram submetidas à focalização isoeétrica em tiras de 11 cm com gradiente de pH 3-10, seguidas por uma segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5% segundo o protocolo descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram corados com Coomassie Coloidal (WANG; LI e LI, 2007), digitalizados (*LabScan software*) e analisados utilizando o programa *Image Master TM 2D Platinum v. 7.0* (GE Healthcare).

5.4 Detecção da SYTX-2 em Raízes, Caules e Folhas de Plantas Jovens e Adultas de soja.

Na **Tabela 04** podem ser visualizados os dados da extração de proteínas de tecidos jovens e adultos de plantas de soja, mantidas em casa de vegetação sob condições ótimas de plantio. Dentro das condições experimentais utilizadas, o processo de extração levou a uma obtenção de um nível quase quatro vezes maior de proteínas das folhas ($4,13 \pm 0,38$ mgP/mL), em comparação com as concentrações obtidas para raízes e caules, quando se consideram os tecidos jovens (estádio V4). As diferenças nas quantidades de proteínas extraídas são menos acentuadas, quando considerados os tecidos adultos, embora das folhas tenham sido obtidas também quantidades maiores de proteínas ($6,23 \pm 0,38$ mgP/mL). Os dados também mostram que, quando comparados aos tecidos jovens, os tecidos adultos apresentaram maior teor de proteínas por grama de tecido, sendo esse aumento, mais pronunciado em raízes e caules do que em folhas. As **Figuras 20** e **21** mostram os perfis protéicos obtidos para os diferentes tecidos nos dois estádios de desenvolvimento utilizados.

Tabela 04. Teor de proteínas em raízes, caules e folhas de plantas jovens e adultas de soja – cv. BRS-Pala. As plantas jovens e adultas utilizadas no processo de extração estavam no estágio V4 e R5, respectivamente. Para o processo de extração, realizado em câmara fria a 4 °C, foram utilizadas massas iguais de cada tecido. As extrações foram realizadas em triplicada e em três repetições

Estágio	Órgão	Massa de tecido (g)	mgP/mL*	mgP/g de tecido
V4 (Jovem)	Raiz	5	1,03 ± 0,18	5,35 ± 0,90
	Caule	5	1,14 ± 0,22	6,45 ± 0,83
	Folha	5	4,13 ± 0,38	20,25 ± 1,84
R5 (Adulta)	Raiz	3	3,63 ± 0,54	39,87 ± 2,90
	Caule	3	4,03 ± 0,44	42,96 ± 4,68
	Folha	3	6,23 ± 0,38	64,40 ± 3,92

*(Bradford, 1976)

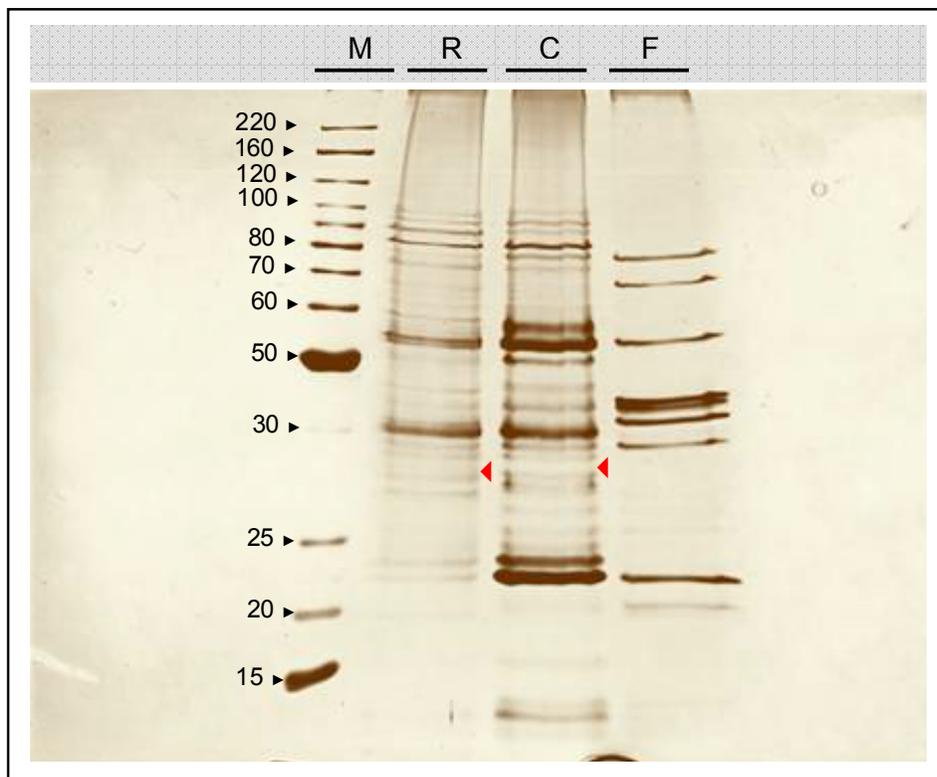


Figura 20. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos protéicos obtidos de raízes (R), caules (C) e folhas (F) de plantas jovens de soja (estádio V4) mantidas em casa de vegetação. Cerca de 30 μgP (em 20 μL de volume de amostra) foram aplicados em cada raia (indicadas por R, C e F). Como marcador de massa molecular (raia M) foram utilizados 10 μl de *BenchMark[®] Protein Ladder* (Invitrogen). As massas dos marcadores são mostradas em kDa e o gel foi revelado com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). (◄) indica proteína de massa molecular aparente de 28 kDa.

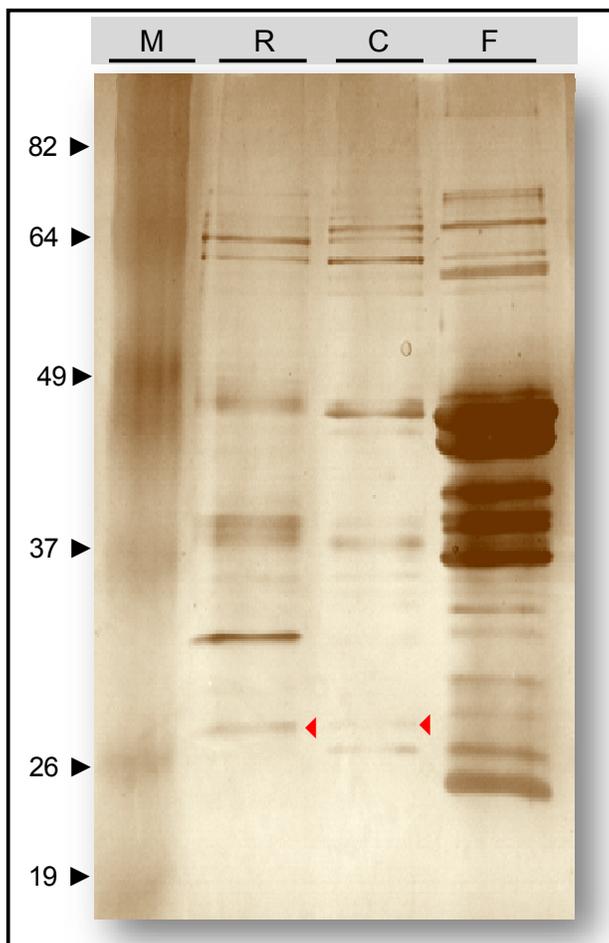


Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos protéicos obtidos de raízes, caules e folhas de plantas adultas de soja (estádio R5). Cerca de 30 μ gP (em 20 μ L de volume de amostra) foram aplicados em cada raia (indicadas por R, C e F). As massas dos marcadores são mostradas em kDa (revelação do gel: nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987)). (◄) indica proteína de massa molecular aparente de 28 kDa.

Em relação à detecção e quantificação de SYTX-2 nos diferentes órgãos utilizados, foi observado que, em tecidos jovens os níveis de toxina detectados foram maiores em raízes, do que em caules e folhas. Nas raízes foram detectados $11,6 \pm 1,88$ μg de SYTX-2/mg de proteína extraída, ao passo que em caules e folhas os níveis observados foram de $7,26 \pm 0,33$ μg de SYTX-2/mg de proteína extraída e $1,38 \pm 0,25$ μg de SYTX-2/mg de proteína extraída, respectivamente. Quando normalizados em função da quantidade de tecido utilizada no processo de extração as raízes apresentaram $62,62 \pm 10,10$ μg de SYTX-2/g de tecido, enquanto os níveis de $41,10 \pm 1,90$ μg e $6,76 \pm 1,25$ μg de SYTX-2 foram detectados em caules e folhas, respectivamente (**Figuras 22 e 23**).

No que diz respeito aos tecidos adultos, observa-se que em paralelo ao incremento da massa protéica já observada nos tecidos, os níveis de SYTX-2 também aumentaram, mostrando que a proteína além de ser expressa em plantas adultas, apresenta-se em níveis maiores do que aqueles detectados em tecidos jovens. Mesmo assim, os níveis detectados para SYTX-2 continuaram maiores em raízes ($4,89 \pm 0,89$ μg de SYTX-2/ mg de proteína extraída) do que em caules ($1,53 \pm 0,06$ μg de SYTX-2/ mg de proteína extraída) e folhas ($0,75 \mu\text{g} \pm 0,01$ de SYTX-2/ mg de proteína extraída) (**Figura 24**).

Comparando-se os níveis de expressão de SYTX-2 apresentados por plantas jovens e adultas, embora os níveis de SYTX-2 /mg de proteína extraída em extratos de raízes, caules e folhas de plantas adultas tenham sido menores do que os observados em plantas jovens, quando os níveis de SYTX-2 foram normalizados em função da massa de tecido (**Figura 25**), foi observado um aumento de três vezes na expressão de SYTX-2 em raízes adultas ($195,12 \pm 35,54$ μg de SYTX-2/g de tecido) em relação às raízes jovens. No caule, os níveis detectados foram menores em tecidos adultos ($16,31 \pm 0,68$ μg de SYTX-2/g de tecido) e nas folhas, não houve alteração significativa no nível de expressão da toxina que foi de $7,82 \pm 0,16$ μg de SYTX-2/ g de tecido.

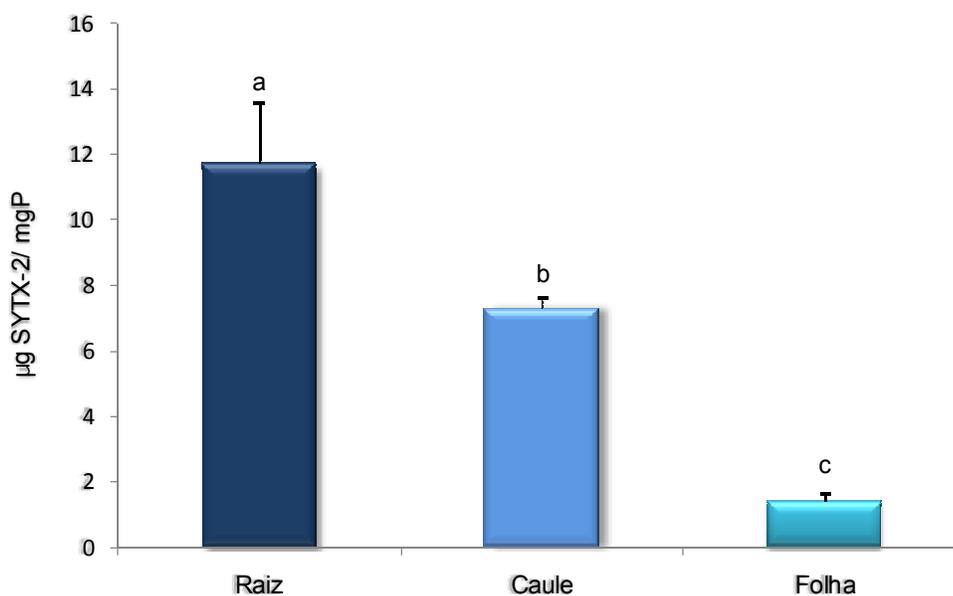


Figura 22. Níveis de SYTX-2 (µg/mg de proteína extraída) detectados em raízes, caules e folhas jovens de soja (estádio V4). A quantificação de SYTX-2 nos extratos dos órgãos vegetativos foi determinada através da técnica de ELISA indireto, usando anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a toxina (diluição 1:1000; v/v). Os ensaios foram realizados em triplicata e em 3 repetições. Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SYTX-2 ($p < 0,05$, Teste de Turkey).

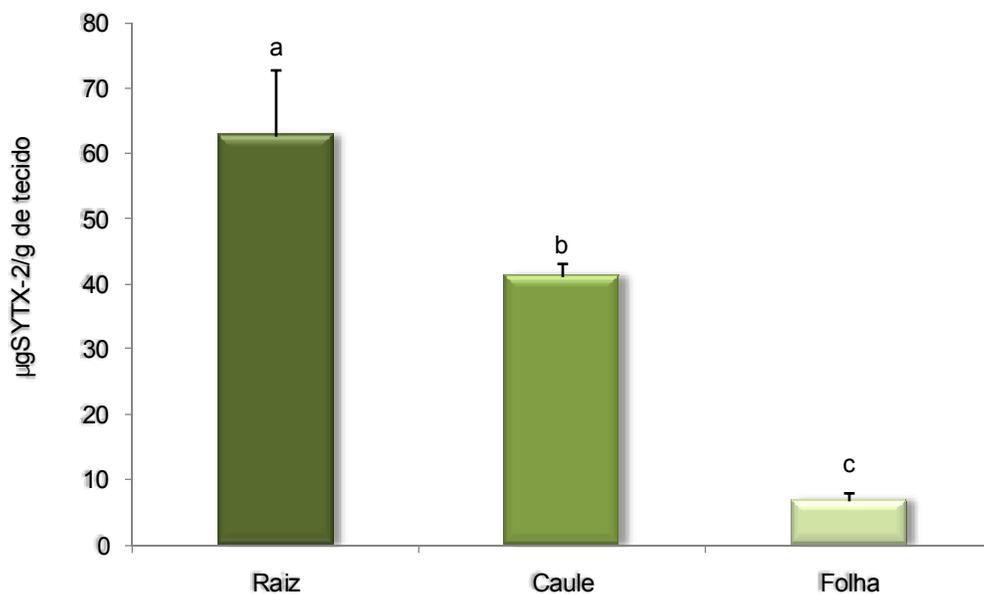


Figura 23. Níveis de SYTX-2 detectados em tecidos jovens de soja, considerando a massa de tecido usada no processo de extração de proteínas. A quantificação de SYTX-2 nos extratos dos órgãos vegetativos foi determinada através da técnica de ELISA indireto, usando anticorpos policlonais contra a toxina na diluição de 1:1000 (v/v). Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SYTX-2 ($p < 0,05$, Teste de Turkey).

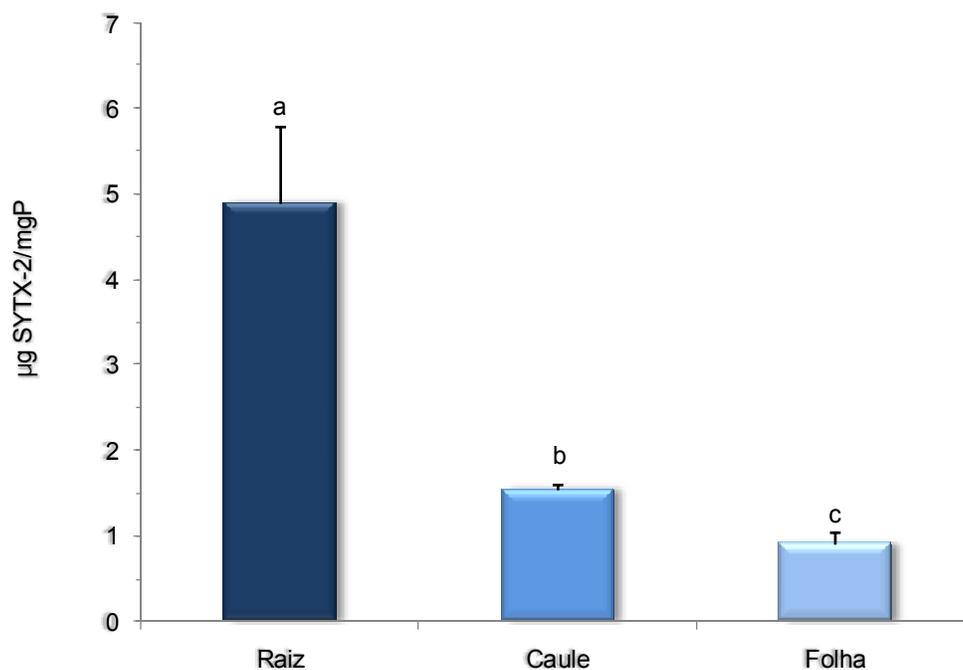


Figura 24. Níveis de SYTX-2 detectados em órgãos vegetativos adultos (estádio R5) de soja. A quantificação da SYTX-2 nos extratos dos órgãos vegetativos foi determinada através da técnica de ELISA indireto, usando anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a toxina. Os ensaios foram realizados em triplicata e em 3 repetições. Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SYTX-2 ($p < 0,05$, Teste de Turkey).

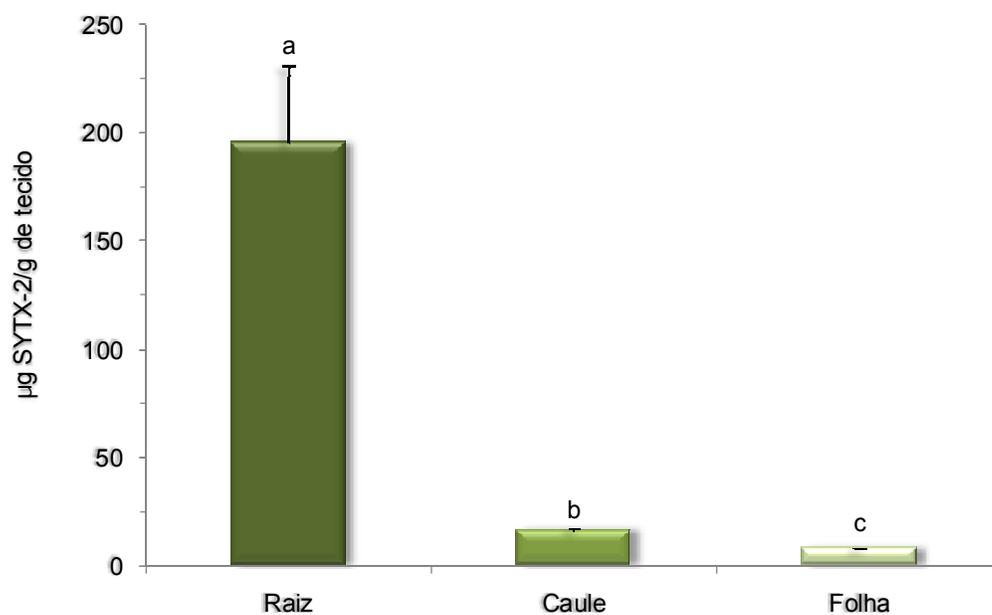


Figura 25. Níveis de SYTX-2 detectados em tecidos adultos de soja, considerando a massa de tecido usada no processo de extração de proteínas. Quantificação de SYTX-2 nos extratos dos órgãos vegetativos através da técnica de ELISA indireto. Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SYTX-2 ($p < 0,05$, Teste de Turkey).

5.5 Indução da expressão da SYTX-2 através de injúria mecânica

Tendo definido os níveis de expressão de SYTX-2 em tecidos adultos (plantas em fase reprodutiva) de soja, a próxima etapa experimental foi avaliar a possível indução nos níveis de expressão dessa toxina em folhas submetidas à injúria mecânica. O processo de indução da expressão através de lesão mecânica foi avaliado levando-se em conta dois aspectos importantes: 1 - alteração dos níveis de toxina em regiões adjacentes ao local da lesão e, também, em folhas não lesionadas da mesma planta, para verificar se a possível alteração nos níveis de toxina seria sinalizada sistemicamente.

Em relação aos níveis de proteínas totais de folhas submetidas e não submetidas à lesão, não foram detectadas alterações significativas nas quantidades de proteínas extraídas das folhas coletadas. Para folhas de plantas controle e de plantas injuriadas foram extraídos $6,16 \pm 0,81$ mgP/mL ou $65,45 \pm 2,36$ mgP/g de tecido. Entretanto, observando-se o perfil eletroforético dos extratos das folhas lesionadas e não lesionadas (**Figura 26**), podem ser notadas algumas diferenças nos níveis de expressão de algumas proteínas, a saber: nas plantas controle não houve alteração no perfil de proteínas extraídas nos tempos de 0, 6 h e 24 h. Na eletroforese é detectada a presença de bandas protéicas distribuídas principalmente na zona de massas moleculares entre 82 e 26 kDa. Para a SYTX-2 os níveis também não foram alterados e se mantiveram em quantidades iguais aos obtidos para tecidos adultos: $0,98 \pm 0,13$ µgP de SYTX-2/mgP extraída ou $6,76 \pm 0,89$ µgP de SYTX-2/g de tecido.

Seis horas após a lesão, o perfil protéico foi alterado não apenas nas folhas submetidas à injúria, mas também em folhas não submetidas à injúria da mesma planta, mostrando que ocorrem mudanças nos níveis de expressão de algumas proteínas, sendo essas mudanças de natureza sistêmica. Na eletroforese, é observado o aparecimento de bandas entre 115 e 82 kDa (não detectadas no grupo controle), bem como o desaparecimento de uma banda na altura de 37 kDa, que era bastante proeminente no controle. Para SYTX-2, nas folhas injuriadas foi observado um aumento significativo de quase duas vezes nos níveis dessa proteína que passaram para $1,66 \pm 0,03$ µgP de SYTX-2/mgP extraída ou $10,46 \pm 0,21$ µgP de SYTX-2/g de tecido (**Figuras 27 e 28**). Esse aumento, não

foi detectado em folhas não submetidas à injúria na mesma planta, mostrando que, embora ocorra alteração sistêmica do perfil protéico das folhas, para SYTX-2, esses níveis se alteram para mais apenas nos sítios adjacentes à lesão.

Uma resposta semelhante também foi observada nas folhas 24 h após a lesão. Houve alteração nos níveis protéicos e essa alteração foi sistêmica, tal como pode ser observado na eletroforese em gel de poliacrilamida. Pode ser verificado o reaparecimento da banda logo acima de 37 kDa e o desaparecimento das bandas de massas moleculares entre 115 e 82 kDa não detectadas em 0 h, mas detectadas 6 h após a lesão. Em relação à SYTX-2, os níveis de proteína detectados retornaram aos valores detectados no grupo controle, mostrando que a cinética de expressão da toxina permite o seu retorno aos níveis normais em 24 h (**Figuras 27 e 28**).

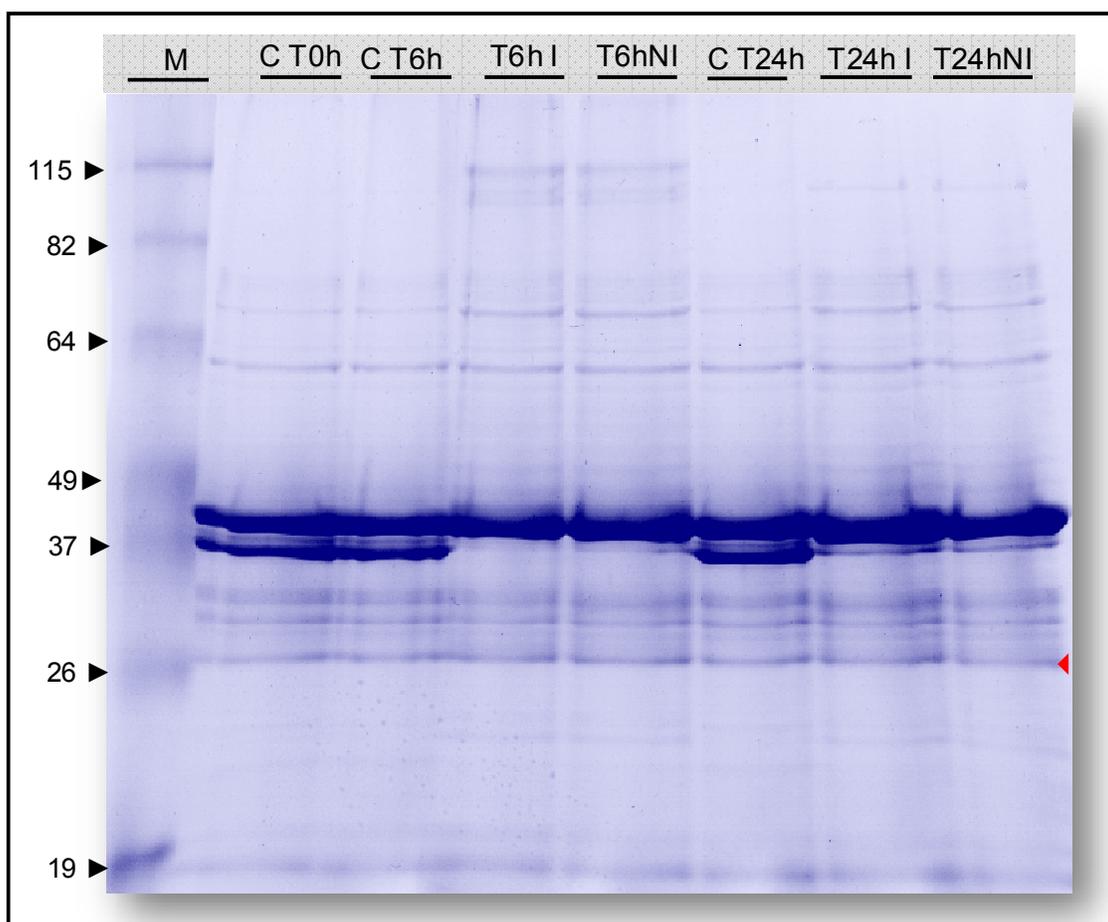


Figura 26. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos totais de folhas de soja (R5) submetidas ou não à injúria mecânica. Os grupos experimentais são indicados na parte superior de cada raia. As amostras foram preparadas em tampão de amostra contendo 2-mercaptoetanol 1% tal como descrito anteriormente, sendo aplicados cerca de 40 µg de proteínas por poço. As massas dos marcadores são mostradas em kDa. (◄) indica proteína de massa molecular aproximada de 28 kDa, conforme determinado pela análise do gel. Legenda: "C": controle; Th: tempo em horas; "I": injúria; "NI": tecido não injuriado;

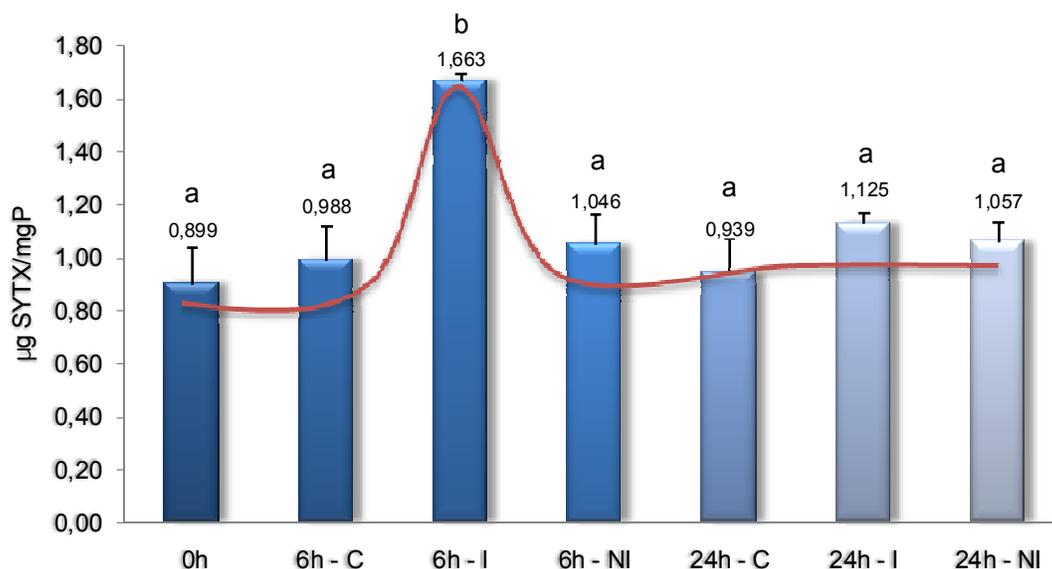


Figura 27. Aumento nos níveis teciduais de SYTX-2 através de indução por injúria mecânica. A quantificação de SYTX-2 nos extratos de folhas adultas foi determinada através da técnica de ELISA indireto usando anticorpos policlonais contra a toxina na diluição de 1:1000. Os níveis de toxina em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas são mostrados na parte superior de cada barra. Traçado em vermelho mostra a cinética de aumento de SYTX-2 após a lesão. Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SYTX-2 ($p < 0,05$, Teste de Turkey). Legenda: C – controle; I – injúria; NI – tecido não injuriado.

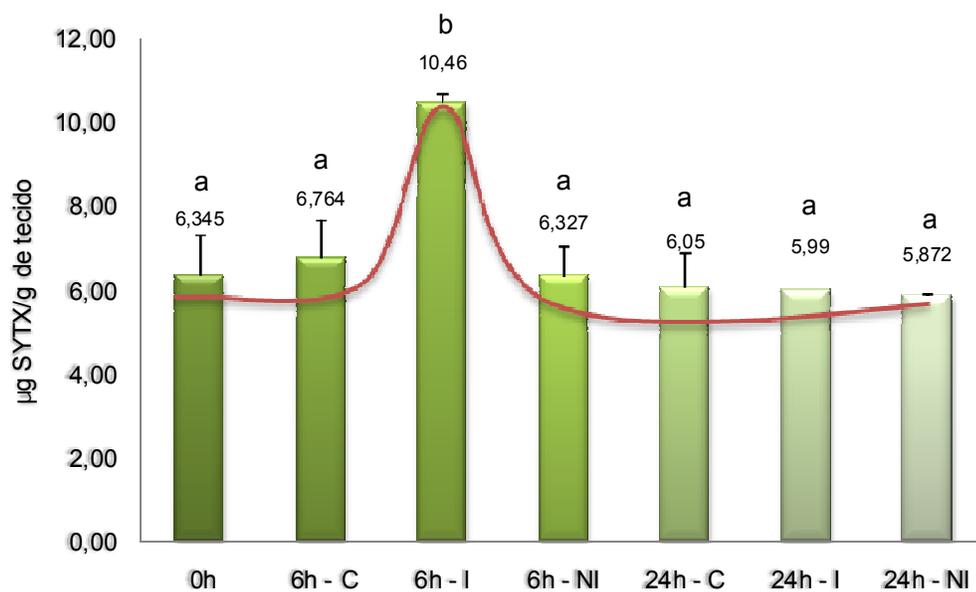


Figura 28. Indução da expressão de SYTX-2 em folhas adultas de soja após injúria mecânica. Os valores são plotados tomando como base a massa de SYTX-2/g de tecido usado no processo de extração. Os níveis de toxina em µg/g de tecido são mostrados na parte superior de cada barra. Traçado em vermelho mostra a cinética de aumento de SYTX-2 após a lesão. Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SYTX-2 ($p < 0,05$, Teste de Turkey).

5.6 Efeito da SYTX-2 contra diferentes espécies de fungos

A atividade antifúngica da SYTX-2 foi avaliada através da capacidade de inibir a germinação de esporos de espécies patogênicas de interesse agrônomo para a soja. *R. solani*, *Phomopsis sp.* e *F. solani* f.sp *glycines* foram as espécies escolhidas para o ensaio de atividade antifúngica em função de estarem entre as espécies de maior ocorrência na soja e, também, de serem transmitidos através das próprias sementes. Para *F. solani* f.sp *glycines*, foi utilizado o isolado SDS-5 considerado o mais patogênico já coletado no Brasil pela EMBRAPA. A toxina foi utilizada nos ensaios nas concentrações de 150 e 200 µg/mL, as quais não foram capazes de inibir a germinação dos esporos das espécies testadas, tal como mostrado na **Figura 29**.

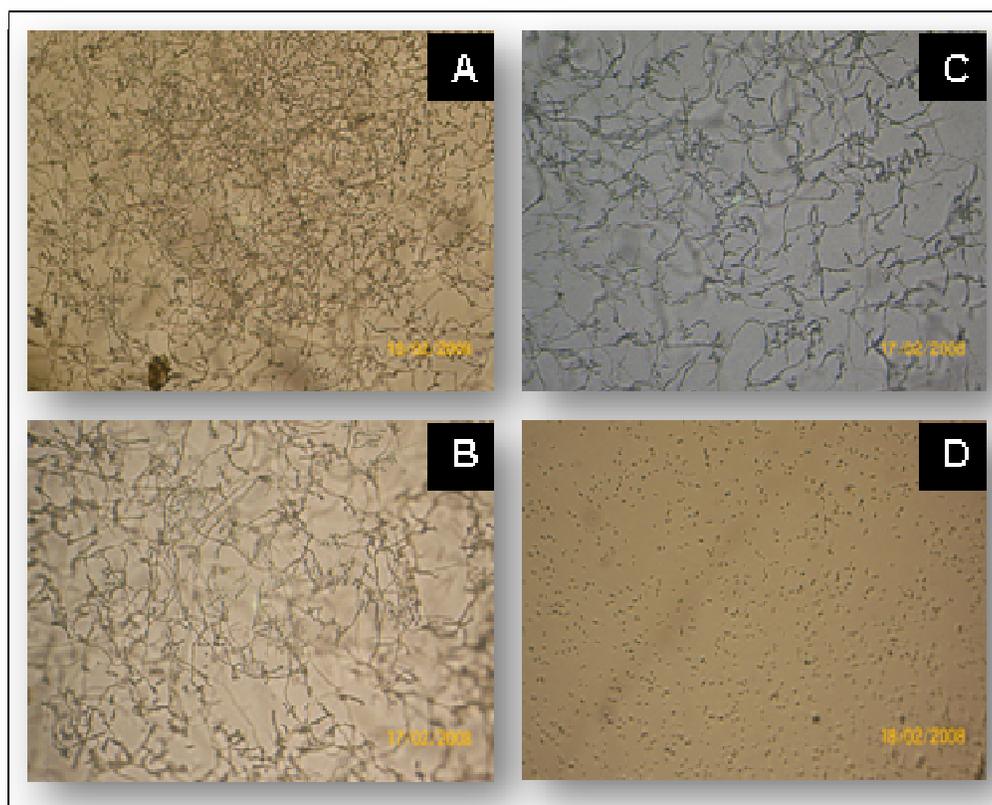


Figura 29 - Imagens de microscopia óptica mostrando a germinação de esporos de *Fusarium solani f.sp. glycines* na presença e ausência de SYTX-2 (aumento total de 100x). “A” esporos germinados na presença de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM; “B” SYTX-2 1,5 µg/10 µL; “C” SYTX-2 2,0 µg/10µL e “D” Peróxido de hidrogênio 100 mM.

A atividade antifúngica de SYTX-2 também foi avaliada contra espécies de fungos leveduriformes do gênero *Candida* através do ensaio de inibição de crescimento. Contra *C. tropicalis* e *C. krusei*, SYTX-2 não foi capaz de inibir o crescimento celular em meio BHI. De forma contrária, para a espécie *C. albicans*, SYTX-2 promoveu uma inibição significativa de 18,0% no crescimento em placa somente na concentração de 73,5 µgP, embora nas demais concentrações de proteína tenham sido observados padrões de crescimento inferiores ao grupo controle.

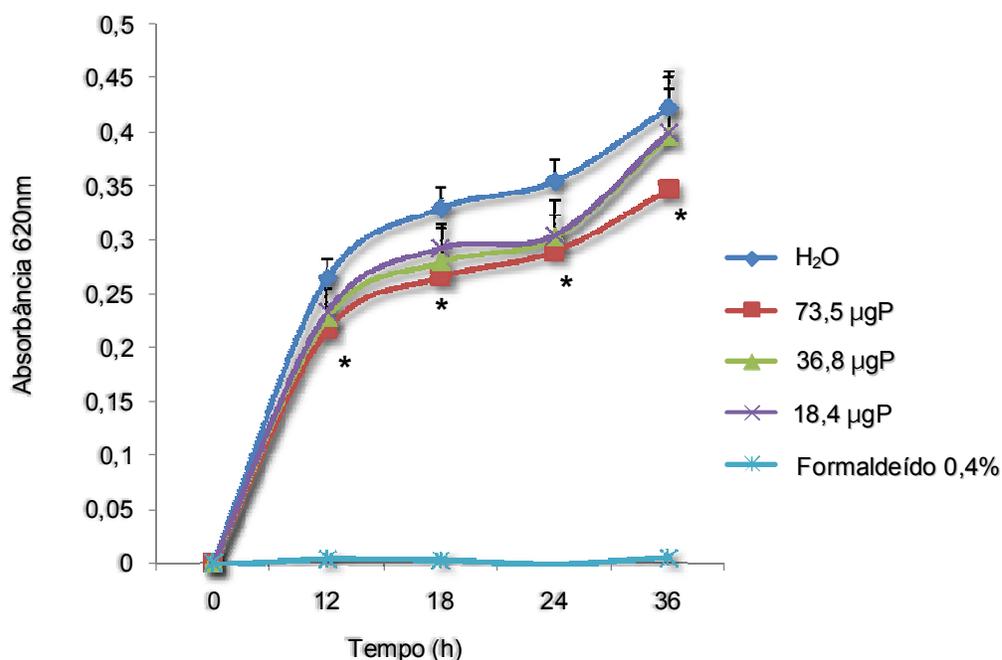


Figura 30. Efeito da SYTX-2 sobre o crescimento do fungo leveduriforme *Candida albicans*. Amostras de SYTX-2 pura (100 µL) solubilizadas em água estéril foram utilizadas nas quantidades mostradas na legenda do gráfico (µgP) e incubadas com 100 µL de uma suspensão das células cuja turbidez foi de 1×10^4 células/ mL em meio líquido BHI – *Brain Heart Infusion*. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando formaldeído 0,4% como controle positivo. (*) Indicam resultados significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Turkey).

5.7 Atividade Nematicida da SYTX-2 Contra J2 de *M. incognita* Raça 4

Além de avaliar o efeito da SYTX-2 contra patógenos de interesse agrônômico, ensaios experimentais foram também conduzidos com o objetivo de verificar a possível atividade da toxina contra formas infectivas (J2) de *M. incognita* raça 4, um dos principais patógenos de solo capazes contaminar a cultura da soja. A atividade nematicida de SYTX-2 foi detectada contra J2 quando os mesmos foram incubados com a toxina na proporção de 1 µg de proteína/nematóide. A indução de mortalidade foi de 20% e o efeito foi observado cerca de 6 h após a incubação com a toxina. Nessa concentração de toxina a mobilidade dos nematóides não foi afetada. Quando os nematóides foram incubados com SYTX-2 11 µg de proteína/nematóide, a mortalidade observada no mesmo intervalo de tempo foi elevada e no valor de 85%, tal como pode ser observado na **Figura 31**. Os demais nematóides que permaneceram vivos encontravam-se imóveis e, após 24 h de contato com a toxina, a mortalidade observada foi de 100%. Para o grupo controle, a mortalidade observada no bioensaio foi de 7% e todos permaneceram móveis ao final do experimento.

No intervalo de 6 h após incubação com a toxina, alguns J2 foram removidos e avaliados por microscopia óptica no intuito de avaliar a sua morfologia, dado o elevado grau de mortalidade alcançado nesse intervalo de tempo. A **Figura 32** mostra que os nematóides incubados com a toxina, além de estarem pouco translúcidos como mostrado no grupo controle, apresentam estruturas semelhantes a “vacúolos” no seu interior, não observadas no grupo controle, sendo esse efeito possivelmente atribuído à toxina.

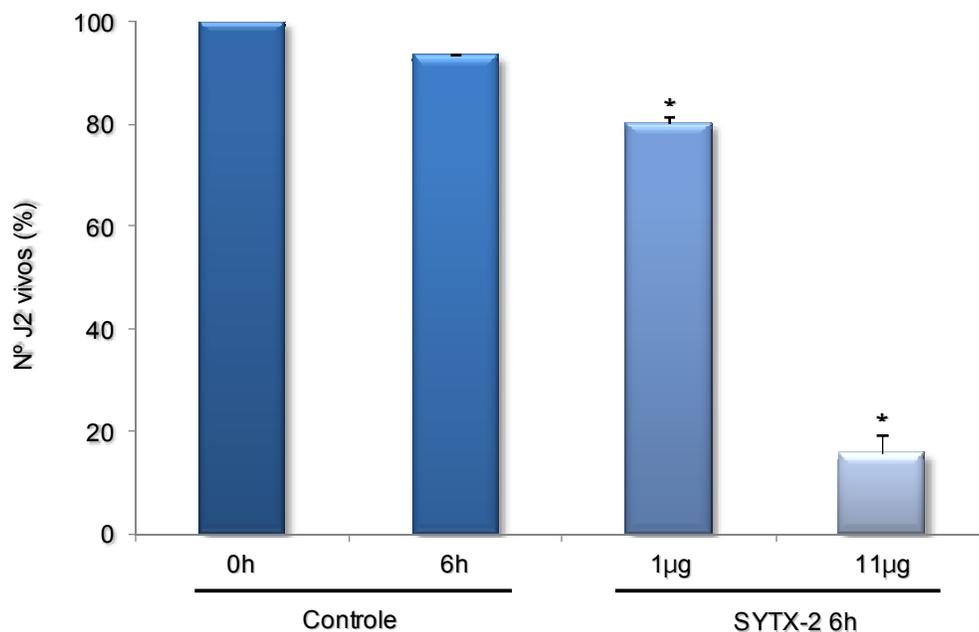


Figura 31. Atividade nematicida da SYTX-2 contra formas juvenis (J2) de *M. incognita*. Amostras de SYTX-2 pura foram solubilizadas em Tris-HCl 25 mM pH 7,5 e adicionadas aos poços de placas de Kline de modo a perfazer 1 µg e 11 µg/nematóide, num total de 55 nematóides/grupo. Os dados mostram apenas o percentual de J2 vivos após o intervalo de 6 h em contato com a toxina. (*) Indicam resultados significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Turkey).

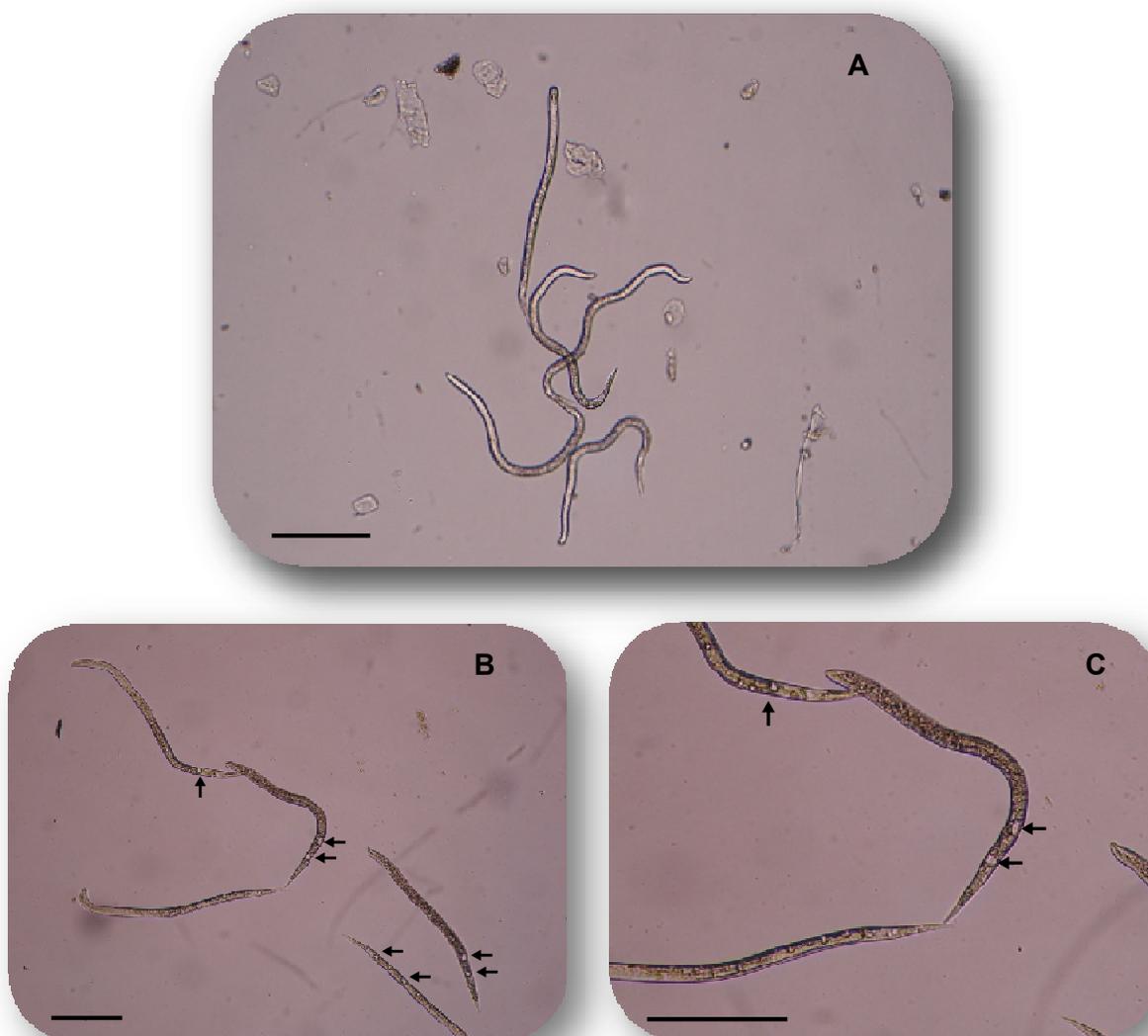


Figura 32. Alterações morfológicas detectadas em formas juvenis (J2) de *M. incognita* após incubação por 6 h com SYTX-2. “A” – grupo controle; “B” e “C” grupo incubado com SYTX-2. Setas indicam “vacúolos” na região interna dos J2, visualizados com maior detalhe em “C”. As imagens foram obtidas a partir de uma alíquota de 10 μ L da suspensão de J2 presente nos poços das placas de Kline. As alterações foram detectadas através de microscopia óptica apenas para os nematóides incubados com a maior concentração da toxina. Aumento total: 100 X (A e B); 200 X em C. Barras: 100 μ m.

6. DISCUSSÃO

A detecção de toxicidade a partir de extratos protéicos de sementes de soja é um evento que tem sido reportado desde a década de 50 (LIENER, 1951) e, atualmente diversas sementes fornecidas pela EMBRAPA apresentam toxicidade em seu extrato total. A cultivar BR-10 avaliada por Sousa (2006), por exemplo, apresentou DL_{50} no valor de $563,0 \pm 22,5$ mgP/kg, ao passo que IAC-17 e IAC-24 apresentaram valores de DL_{50} de $684,51 \pm 2,07$ e $537,57 \pm 4,56$ mgP/kg, tal como determinado por Morais (2007). Para BRS-Pala, utilizada neste trabalho, a DL_{50} encontrada para o extrato total de sementes foi de $653,0 \pm 30,35$ mgP/kg. Em conjunto, os dados anteriores mostram que a toxicidade é uma característica presente em grande parte das cultivares de soja fornecidas pela EMBRAPA, embora os teores de toxinas presentes nas sementes sejam variados.

A toxicidade detectada no extrato total de soja foi atribuída à presença de proteínas bioquimicamente distintas e chamadas de SYTX, SYTX-2 e SBTX, as quais apresentam como parâmetro comum a capacidade de induzir convulsões tônico-clônicas se injetadas em camundongos pela via intraperitoneal ou endovenosa, mas não quando administradas oralmente. Trabalhando com a mesma cultivar (BR-10), Sousa (2006) e Siebra (2004) obtiveram um rendimento de SYTX-2 e de SBTX de $68,3 \pm 1,0$ mgP/100gF e de $30,0 \pm 1,0$ mgP/100gF, respectivamente, mostrando que boa parte da atividade tóxica atribuída ao extrato total de sementes de soja se deve à presença de SYTX-2. Neste trabalho, a partir da cultivar BRS-Pala, foram obtidas $81,75 \pm 0,84$ mg de SYTX-2/100 gF, sendo esse valor, superior ao obtido por Sousa (2006). O maior rendimento apresentado para a obtenção de SYTX-2, em detrimento da menor toxicidade apresentada por BRS-Pala, se deve aos inibidores de proteases PMSF e Pepstatina A utilizados no processo de purificação da SYTX-2 descrito nesta tese.

A partir dos rendimentos apresentados para SYTX-2 foi possível estimar o teor total de toxina apresentado por sementes de soja, que foram iguais a 58,05 µgP o que equivale a 0,04% da massa de uma semente, sendo esse valor, menor do que àquele obtido para CNTX que representa cerca de 0,5% da massa seca de sementes de *C. ensiformis* (STANIÇUASKI *et al.*, 2005).

O sequenciamento NH₂ – Terminal de SYTX-2 levou à obtenção de 16 resíduos de aminoácidos, os quais apresentaram grande similaridade com muitas proteínas presentes na soja, não representando, portanto, um parâmetro para inferência de seu papel funcional. Adicionalmente, a sequência NH₂ - terminal de SYTX-2 não apresentou similaridade com a sequência de aminoácidos deduzida de SBTX 27 kDa descrita no Capítulo 3, mostrando que, embora exerçam efeitos tóxicos de sintomatologia semelhante contra camundongos, essas proteínas não parecem apresentar similaridades em suas estruturas primárias.

Por outro lado, a determinação do ponto isoelétrico da SYTX-2 mostrou que essa proteína é constituída por dois spots de pontos isoelétricos ácidos (5,11 e 5,24). Os pI's apresentados pelos spots corroboram com o fato de que em pH 7,5, essas proteínas estariam negativamente carregadas, sendo portanto, capazes de se prender em coluna de DEAE-Celulose, de onde são eluídas através da aplicação de um gradiente salino. Os pontos isoelétricos apresentados por SYTX-2 são próximos àqueles descritos para SYTX que apresentou duas a três bandas protéicas de pontos isoelétricos 4,4 e 4,6 (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

Anticorpos policlonais anti-CNTX foram capazes de reconhecer a banda correspondente à SYTX-2 (dados não apresentados) tal como descrito também para SYTX e para SBTX. Dessa forma, é possível que SYTX e SYTX-2 façam parte de um grupo de toxinas ácidas, estrutural e funcionalmente relacionadas, presentes em sementes de soja e que, embora apresentem características físico-químicas distintas, possuem características estruturais comuns àquelas apresentadas por CNTX o que explicaria a reação cruzada com anticorpos produzidos contra essa proteína. Além disso, Vasconcelos *et al.* (2008) mostraram que anticorpos anti-SBTX também são capazes de reconhecer SYTX-2 mostrando que a similaridade estrutural também deve existir entre essa proteína e a toxina da soja.

Através do uso de eletroforese bidimensional e da tecnologia de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT), Agrawal e colaboradores (2008) mostraram que, das proteínas identificadas em sementes de soja, cerca de 40 delas apresentam massas moleculares de 20 - 30 kDa e que cerca de 82 proteínas possuem ponto isoelétrico entre 5 e 6, havendo portanto o predomínio

de proteínas com massas moleculares baixas e de pl ácido. SYTX-2 e SYTX fazem parte desse grupo de moléculas abundantes nas sementes. Esse dado justifica os valores diferenciais de rendimento obtidos por Siebra (2004) e Sousa (2006), o qual aponta rendimentos duas vezes maiores para SYTX-2 em comparação ao apresentado por SBTX.

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma das técnicas mais úteis no estudo estrutural de proteínas, uma vez que suas unidades básicas, resíduos de aminoácidos, possuem centro quiróforo (grupo amida ligado ao carbono α , que é assimétrico). A análise de um espectro de CD geralmente se concentra na região do UV distante (180 -250 nm) onde as transições em 210 e 190 nm da amida estão compreendidas (CAMPBELL *et al.*, 1984). A partir da técnica de CD foi possível definir o padrão de estrutura secundária apresentado pela SYTX-2 e compará-lo ao de outras neurotoxinas imunologicamente relacionadas. Os percentuais de estrutura secundária obtidos para SYTX-2 mostram que essa toxina apresenta um padrão estrutural semelhante àquele observado para SBTX e CNTX, sendo o seu teor de α -hélice e folhas- β , quase idênticos aos apresentados pela toxina da soja. Esse é o primeiro estudo comparativo realizado com padrões de estrutura secundária apresentados para neurotoxinas vegetais e os dados obtidos mostram que as semelhanças estruturais observadas podem justificar o reconhecimento cruzado com anticorpos produzidos para essas proteínas, visto que não foram, até o momento, detectadas similaridades na estrutura primária dessas moléculas.

Além de fornecer informações acerca da estrutura secundária, o espectro de dicroísmo circular de uma molécula é uma ferramenta de grande importância no estudo de mudanças conformacionais induzidas por interações da proteína com ligantes específicos, assim como verificar alterações ocorridas em função da temperatura, pH, força iônica e monitorar fenômenos de desnaturação e renaturação na interação com ligantes (CANTOR *et al.*, 1980).

Experimentalmente, foi verificado que SYTX-2 é uma proteína instável frente ao calor, sendo sua toxicidade somente mantida a 4 °C e na presença de agentes redutores como DTT. Através da técnica de CD, foi determinado que os padrões de estrutura secundária observados para a proteína nativa são perdidos com aumentos progressivos de temperatura até um valor máximo de 95 °C, no

qual a proteína apresenta estrutura completamente desordenada. Um dado inédito mostrado aqui é que, com a diminuição progressiva na temperatura de 95 °C para 25 °C a toxina recupera praticamente toda a sua estrutura secundária, demonstrando uma destacável capacidade para redobramento. Entretanto, amostras de SYTX-2 aquecidas perdem definitivamente sua atividade tóxica mesmo após terem sido resfriadas. Assim, embora os padrões de estrutura secundária sejam restabelecidos, a estrutura nativa da molécula não é recuperada na sua totalidade

Quando proteínas são redobradas *in vitro*, a formação de agregados freqüentemente interfere com o enovelamento e pode diminuir grandemente a parcela de proteínas com estrutura nativa e, portanto, funcionais (MIDDELBERG, 1996; BUSHWELL e MIDDELBERG, 2002). Esses agregados formados parecem surgir devido a estados intermediários que expõem regiões hidrofóbicas da molécula deixando-a mais susceptível à auto-associação (FISCHER, SUMNER e GOODENOUGH, 1993; SPEED, WANG e KING, 1996). A formação de agregados é um evento que foi observado não só para SYTX-2, mas também para a SYTX (VASCONCELOS *et al.*, 1994). Essas proteínas, após serem submetidas ao aquecimento, na preparação de amostras para eletroforese, mostraram, algumas vezes o aparecimento *in gel* de bandas de, aproximadamente, 100 kDa, mesmo quando puras.

A partir dos estudos de dicroísmo circular frente a diferentes temperaturas foi, também, possível determinar a temperatura média de desnaturação da molécula, no valor de 49,6 °C, outro dado inédito nos estudos estruturais de neurotoxinas vegetais.

A espectroscopia de emissão estática também é largamente utilizada para caracterizar macromoléculas biológicas e verificar mudanças conformacionais no microambiente dos grupos fluorescentes naturais (fluoróforos) como triptofano, fenilalanina e tirosina. A fluorescência desses resíduos é altamente sensível ao ambiente em que se encontram e, portanto, é possível monitorar suas alterações através de parâmetros como o máximo de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$) (LAKOWICZ *et al.*, 1999). Para SYTX-2 o máximo de emissão de fluorescência foi a 323 e 333 nm, um indicativo de resíduos de triptofano internalizados na proteína. Os dados espectroscópicos obtidos para SYTX-2 até então, além de fornecerem

características estruturais dessa molécula, abrem a perspectiva de estudar as possíveis alterações na estrutura de SYTX-2 frente a ligantes ou condições experimentais, permitindo um melhor entendimento de seu papel funcional.

A despeito da atividade tóxica apresentada contra camundongos, SYTX-2 foi capaz de hidrolisar, *in vitro* moléculas de RNA, apresentando, portanto atividade ribonucleásica. As ribonucleases (E.C. 3.1.27.1) desempenham um papel chave no desenvolvimento vegetal devido à sua capacidade de modificar os níveis celulares de RNA e, portanto, de síntese protéica (TVORUS, 1976 apud FRANCO *et al.*, 2001 p. 358). Moléculas com atividade ribonucleásica foram estudadas em diferentes tecidos de *Vigna unguiculata* durante a germinação e desenvolvimento de plântulas, bem como em cotilédones, tecidos de onde foram purificadas e caracterizadas (GOMES-FILHO *et al.*, 1999). A atividade ribonucleásica apresentada por SYTX-2 ($1821,42 \pm 3,34$ UA. h⁻¹ mgP) foi similar à atividade da ribonuclease de raízes (16,3 kDa) de *V. unguiculata* cv. Pitiúba (FRANCO *et al.*, 2001). Com relação aos mecanismos de defesa vegetal, moléculas tipo ribonuclease – *like*, fazem parte da família de PR-10, cuja massa molecular dos membros já descritos situa-se em torno de 17 kDa (SOMSSICH *et al.*, 1986; SELS *et al.*, 2008). Vários membros de PR proteínas acumulam-se em plantas infectadas por patógenos e algumas moléculas como quitinases, peroxidases e proteínas com atividade ribonucleásica pertencente à família PR-4 possuem atividade antifúngica *in vitro* (WELIDER *et al.*, 1992; CAPORALE *et al.*, 2004). Em função da massa molecular encontrada para SYTX-2, não podemos classificá-la como membro da família PR-10, não sendo possível avaliar a significância funcional da atividade enzimática encontrada em relação aos mecanismos de defesa vegetal.

Embora muitas características estruturais de SYTX-2 tenham sido descritas até então (nesta tese e em trabalhos de Sousa, 2006) os mecanismos envolvidos na interação dessa proteína com alvos biológicos ainda não haviam sido descritos. Em nossos trabalhos experimentais foi demonstrado que SYTX-2 não possui atividade hemaglutinante direta, mas foi capaz de aglutinar eritrócitos quando incubada em presença de anticorpos policlonais anti-SYTX-2. Diferentemente do observado para abrina e ricina, que interagem com D-galactose, a atividade hemaglutinante de SYTX-2 foi inibida por manose 0,1 M,

mostrando que SYTX-2 é uma hemilectina manose-ligante. Carlini e Guimarães (1991) mostraram que a canatoxina também se comporta como uma hemilectina capaz de interagir com glicoconjugados complexos, em particular com moléculas polisialiladas e gangliosídeos de forma semelhante ao que ocorre com as neurotoxinas tetânica e botulínica (EIDELS *et al.*, 1983). Essa interação permitiu inferir que CNTX pode exercer efeitos neurotóxicos provavelmente através da interação com glicanos presentes na superfície neuronal.

SYTX-2 apresenta atividade pró-inflamatória em ratos, induzindo a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal quando injetada na dose de 100 µg de proteína/cavidade. A resposta pró-inflamatória detectada está possivelmente associada à toxicidade intraperitoneal apresentada por SYTX-2, visto que, ao serem autopsiados, camundongos que receberam doses letais de SYTX-2 apresentaram sinais típicos de inflamação peritoneal (dados não apresentados). A indução de migração neutrofílica como uma sinal de toxicidade tem sido descrita para outras lectinas vegetais, como aquelas purificadas de *Pisum sativum*, *Dioclea grandiflora*, *Glycine max*, *Vatairea macrocarpa*, *Artocarpus intergrifolia*, *Artocarpus incisa* e *Talisia esculenta* (MOREIRA *et al.*, 1983; BENTO *et al.*, 1993; SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; BENJAMIN *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 1999; ALENCAR *et al.*, 2003; FREIRE *et al.*, 2003; BRANDO-LIMA, *et al.*, 2005).

Trabalho experimental realizado por Coelho e colaboradores (2006) mostrou que a lectina de sementes de *Annona coriacea* foi capaz de induzir a migração neurofílica para a cavidade peritoneal de camundongos, a qual foi significativamente inibida por D-manose, mas não por D-glucose ou D-galactose, mostrando que glicanos de superfície contendo manose são sítios importantes para a atividade pro-inflamatória de muitas proteínas. Assim, a atividade pró-inflamatória de SYTX-2 em ratos, também pode ser ocasionada pelo mesmo mecanismo apresentado pela lectina de *A. coriacea*. Em adição, pelo menos em mamíferos, a interação com carboidratos parece mediar os efeitos tóxicos dessa proteína, tal como apresentado também para CNTX.

SYTX-2 é uma proteína que tem sido purificada a partir do extrato total de sementes inteiras de soja. Trabalhos recentes (SANTOS *et al.*, 2008 e MOISE *et al.*, 2005) têm mostrado que a casca de uma semente, não representa meramente

uma barreira física e protetora, mas contém uma série de moléculas que participam de processos como regulação da embebição, manutenção de sua integridade estrutural e defesa vegetal. Tal como mostrado na introdução, da casca de sementes de soja foram isoladas várias proteínas relacionadas à defesa algumas delas, com atividade fosfatase ácida e peroxidásica, capazes de inibir o crescimento micelial de *F. lateritium* e *F. oxysporum*.

A administração intraperitoneal do extrato da casca de sementes de soja induziu convulsões tônico-clônicas seguidas de morte em camundongos, tal como descrito para o extrato obtido de sementes inteiras. Utilizando anticorpos policlonais anti-SYTX-2 foi possível detectar a toxina no extrato da casca, dado esse confirmado pela presença de uma banda protéica de massa molecular aparente de 28 kDa através de eletroforese em gel de poliacrilamida. A toxicidade descrita anteriormente foi observada somente para o extrato concentrado, mostrando que os níveis de toxina expressos na casca são inferiores àqueles descritos para a semente. Dados os efeitos deletérios apresentados pela toxina contra os insetos *C. maculatus* e *D. peruvianus* é possível inferir que a distribuição dessa proteína em todas as partes da semente, denota o seu importante papel na defesa contra espécies que atacam sementes em armazenamento, já que a casca é a primeira barreira natural encontrada por esses organismos.

SYTX-2 também parece exercer um papel protetor para as sementes durante a germinação. Durante a fase de embebição, as sementes de soja exsudam proteínas relacionadas à defesa vegetal, como fosfatase ácida e peroxidases que *in vitro*, já apresentaram atividades contra fungos (SANTOS *et al.*, 2008). Em campo, de acordo com indicações da EMBRAPA, a soja deve ser plantada em solos de pH entre 5,0 e 6,0, visto que valores de pH diferentes desses interferem na disponibilidade de nutrientes minerais para a plantas. *In vitro*, em pH 5,0 e temperatura de 27-28 °C, as sementes da cultivar BRS-Pala exsudaram proteínas em um perfil temporal que atinge o máximo de exsudação em 18 h. SYTX-2 é exsudada das sementes obedecendo também essa variação temporal, juntamente com outras proteínas presentes nas sementes, as quais são em sua maioria, de pl ácido.

A importância funcional de SYTX-2 para plantas de soja é também mostrada pela sua distribuição não restrita apenas na casa e nos cotilédones, mas também em raízes, caules e folhas de plantas jovens e adultas mantidas em casa de vegetação. Em tecidos jovens SYTX-2 está presente em raízes em teores quase dez vezes superiores àqueles detectados em folhas. Nesses últimos órgãos a expressão da SYTX-2 não se altera, quando consideradas as plantas adultas. Entretanto, na raiz o nível de expressão em plantas adultas é triplicado, mostrando que essa proteína exerce um papel biológico relacionado à sua presença nesse tecido. Esse dado é corroborado com o achado experimental que *in vitro* mostra que SYTX-2 foi capaz de induzir a mortalidade de 85% das formas infectivas de *M. incognita* Raça 4 (J2), quando esses nematóides foram incubados por apenas 6 h com a toxina e de 100% após 24 h de incubação.

SYTX-2 também foi capaz de induzir alterações morfológicas em J2, perceptíveis à microscopia óptica, denotando sua interação com estruturas de J2. Uma pesquisa experimental envolvendo a avaliação da capacidade de interação de diversas lectinas com especificidade para diferentes açúcares com a cutícula de J2 mostrou que essa estrutura é constituída principalmente de carboidratos tipo D-manose, D-glucose e N-acetil-D-glucosamina e menores quantidades de D-fucose e D-galactose (AL-YAHYA, 1996). Assim, dada a capacidade dessa proteína em interagir com manose é possível que o efeito nematicida de SYTX-2 tenha sido mediado através da interação com a cutícula do nematóide.

Para nematóides do gênero *Meloidogyne*, a quase totalidade da literatura retrata o controle biológico dessa espécie através da ação de bactérias do gênero *Pasteuria*. Essas bactérias do solo aderem à cutícula do nematóide colonizando ovos, larvas e adultos. Embora promissora, não existe até o momento aplicação em grande escala dessa bactéria, além desses organismos serem específicos para determinadas espécies-alvo (FRAGOSO, 2006). Esses dados demonstram que a busca por mecanismos naturais de resistência ambientalmente seguros são práticas necessárias para o controle de *M. incognita*. Dentro desse contexto, SYTX-2 configura-se como um candidato importante para essa estratégia, dada a sua expressão em raízes e sua potente atividade contra esses patógenos, verificada *in vitro*. Esse é o primeiro estudo que mostra a potente atividade de uma toxina protéica vegetal contra um nematóide de importância agrônômica para

a soja, associando a atividade observada *in vitro* com a localização tecidual determinada por ELISA.

A literatura mostra que vários são os fatores e moléculas envolvidas nos processos de defesa, alguns dos quais são moléculas sinalizadoras distribuídas sistemicamente. Em solanáceas, onde essas respostas são bem descritas, a injúria mecânica ou o ataque de insetos ativam genes como inibidores de proteases aspárticas e carboxipeptidases tanto local como sistemicamente. Essa indução é mediada por um sinal móvel de 18 resíduos de aminoácidos chamado de sistemina envolvendo uma cascata complexa de sinais com a participação de sinalizadores como ácido linoléico e jasmônico (LI *et al.*, 2002; RYAN e MOURA, 2002; DÍEZ-DÍAZ *et al.*, 2004; TÜRRA *et al.*, 2009). Vários dos produtos desses genes, que incluem também quitinases, glucanases, osmotinas etc, são efetivos contra nematóides sendo, por isso, explorados em organismos geneticamente modificados (URWIN *et al.*, 1998; CAI *et al.*, 2003).

Na cultivar BRS-Pala, a indução de injúria mecânica em folhas elevou para quase o dobro os níveis de SYTX-2 expressos em tecidos adultos, 6 h após a lesão tecidual, demonstrando que, tal como ocorre para outras proteínas efetivas contra nematóides, SYTX-2 é induzida por injúria tecidual. Apesar dos níveis de SYTX-2 não terem sido medidos em raízes, sabe-se que a indução na modificação foi sistêmica e transiente. As modificações no perfil de proteínas expressas foram observadas não só nos tecidos submetidos à injúria, mas também em folhas não lesionadas da mesma planta e 24 h após a indução os níveis de SYTX-2 voltaram aos valores normais. Este é mais um dado que reforça o grande potencial biotecnológico apresentado por SYTX-2 em relação ao biocontrole de nematóides.

Em soja, diversas proteínas relacionadas à defesa vegetal, são induzidas após injúria tecidual. Mason e Mullet (1990) mostraram que *Vegetative Storage Proteins*, tiveram um aumento nos níveis de seus transcritos em plântulas submetidas ao déficit hídrico, injúria e tratamento com ácido jasmônico. Graham e colaboradores (2003) mostraram que glucanos elicitores provenientes de *P. sojae* induziram a expressão de várias PR proteínas em plantas de soja, sendo essa resposta também obtida com o tratamento com ácido jasmônico. Morais (2007) mostrou que SBTX é induzida em sementes de soja após o tratamento com ácido

jasmônico, sendo os maiores níveis de toxina detectados 24 h após o contato com esse composto. Dessa forma, o aumento de SYTX-2 observado em tecidos submetidos à injúria pode ter sido mediado pela participação do ácido jasmônico, tal como descrito para outras proteínas de defesa induzidas em plantas de soja.

Embora tenha apresentado uma potente atividade nematicida, SYTX-2 não foi efetiva em inibir a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos, mostrando que essa proteína atua mais especificamente na defesa contra nematóides além de apresentar atividade tóxica contra insetos. Na verdade, as atividades contra fungos aqui mostradas são o complemento do trabalho experimental iniciado por Sousa (2006), no qual foram testadas sete espécies de fungos fitopatogênicos através de, pelo menos três metodologias distintas de ensaios biológicos, os quais também mostraram que essa proteína não apresenta atividade antifúngica. Mesmo com os efeitos negativos detectados contra fungos fitopatogênicos, ao ser avaliada contra fungos do gênero *Candida*, SYTX-2 foi capaz de inibir em aproximadamente 18% a taxa de crescimento apenas de *C. albicans*, mas não de *C. tropicalis* e *C. krusei*, sendo esse efeito considerado espécie-específico.

7. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

- SYTX-2 é uma proteína que apresenta pl ácido, comportando-se como uma hemilectina capaz de interagir com D-manose. Dadas as diferenças físico-químicas mostradas entre SYTX-2 e SYTX, as quais demonstram claramente que essas moléculas não são isoformas, sugere-se que SYTX-2 seja mais adequadamente chamada de ***Glycine max* – Toxin, Gm-TX**.
- Os padrões de estrutura secundária determinados por dicroísmo circular mostraram que SYTX-2 apresenta similaridades estruturais com SBTX e CNTX, fato que pode justificar o reconhecimento de SYTX-2 por anticorpos anti-CNTX e anti-SBTX.
- SYTX-2 é uma proteína distribuída amplamente em plantas de soja. A biodistribuição de SYTX-2 parece estar correlacionada com a função da proteína para o vegetal, visto que maiores níveis de expressão foram detectados em raízes e a proteína apresenta atividade contra *M. incognita*.
- Além de amplamente distribuída, a toxina é também exsudada por sementes de soja, um evento biológico associado à defesa de sementes durante a germinação.
- Tal como descrito para muitas proteínas relacionadas à defesa vegetal, particularmente contra nematóides e insetos, SYTX-2 é induzida em folhas de soja após a injúria mecânica. Esse dado também pode ser funcionalmente associado à atividade inseticida apresentada pela proteína.
- SYTX-2 apresentou uma potente atividade nematicida contra *M. incognita*, embora *in vitro* dentro das condições experimentais testadas não tenha sido capaz de inibir a germinação e o crescimento de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos.

***Isolamento, Clonagem e
Caracterização do cDNA
da Toxina da Soja - SBTX***

1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das principais espécies cultivadas no Brasil, correspondendo a uma área de quase 22 milhões de hectares plantados em território nacional, resultante do grande valor nutritivo e econômico (42% dos produtos nacionais exportados) de seus grãos, bem como da multiplicidade de aplicações que eles possuem na alimentação humana e animal. Apesar da expressiva produção apresentada pelo Brasil, o seu potencial produtivo ainda pode chegar a 4000 kg/ha, muito embora esses valores dificilmente sejam atingidos pelos agricultores, em decorrência, particularmente, de doenças e características relacionadas às condições de plantio.

Como tentativa de minimizar o impacto de condições edafoclimáticas desfavoráveis, existe uma tendência atual entre os produtores em buscar áreas mais propícias ao plantio, abandonando pequenas áreas cuja produtividade tenha sido diminuída em virtude de condições insuficientes para atender as necessidades fisiológicas da soja. Ainda que essa medida tenha promovido um aumento na produção de grãos, a expansão da lavoura da soja para outras regiões aumentou também a ocorrência de doenças causadas por fungos (CONAB, 2008).

Do ponto de vista econômico, o uso de genótipos resistentes de soja tem sido a alternativa mais viável para minimizar os danos causados por patógenos, visto que o uso de defensivos químicos além de ser uma prática dispendiosa, não tem se mostrado efetivo para o controle de algumas doenças fúngicas, como a ferrugem asiática.

Porém, mesmo com a existência de genótipos resistentes a muitas doenças fúngicas e com o potencial de utilização de algumas proteínas no controle dessas doenças, poucos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de estudar e validar genes ou proteínas de defesa como estratégia de controle de patógenos. O potencial de utilização dessas proteínas no controle de patógenos depende, como já descrito, do conhecimento das atividades apresentadas pelas proteínas contra alvos de controle e, também, dos genes que codificam essas moléculas, de modo que sua expressão possa ser regulada na própria planta ou

mesmo possam ser transferidos para outras espécies, cujas técnicas de regeneração *in vitro* já tenham sido estabelecidas.

A toxina da soja (SBTX, 44 kDa) é uma proteína isolada de sementes capaz de interferir em parâmetros importantes do desenvolvimento biológico dos insetos-praga *Callosobruchus maculatus* e *Dysdercus peruvianus*, além de inibir o crescimento do fungo *Cercospora sojina* Hara, bem como dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium hergueli* (relacionados a doenças de armazenamento das sementes de soja), atuando através de mecanismos que independem da permeabilização da membrana celular dos fungos testados (SIEBRA, 2004; MORAIS, 2007). Embora esses resultados forneçam evidências do envolvimento da SBTX na defesa da soja, sua caracterização bioquímica e funcional, bem como sua utilização como estratégia de controle de doenças, dependem do conhecimento de detalhes da estrutura e perfil de expressão de seu gene em diferentes partes do vegetal. Este capítulo foi proposto, portanto, com o objetivo de responder aos seguintes questionamentos:

- *O isolamento, clonagem e caracterização do gene de SBTX permitiriam um entendimento mais aprofundado sobre a função biológica dessa proteína em plantas de soja?*
- *SBTX possui algum domínio protéico ou detalhe estrutural similar ao observado em outras proteínas envolvidas na defesa vegetal?*
- *Transcritos para SBTX podem ser detectados em outras partes do vegetal além de sementes?*
- *Além das atividades apresentadas in vitro, existe alguma evidência da participação dessa proteína na defesa contra fungos in planta?*

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Isolar, clonar e caracterizar o cDNA que codifica a toxina da soja - SBTX;
- Caracterizar bioquímica e funcionalmente a sequência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA isolado da toxina;

2.2 Específicos

- Isolar e clonar o cDNA que codifica a toxina da soja utilizando iniciadores específicos produzidos a partir da sequência NH₂-Terminal da suas cadeias polipeptídicas;
- Caracterizar bioquímica e funcionalmente a sequência de aminoácidos deduzida da toxina, através de bioinformática, e comparar os dados obtidos com os resultados já descritos experimentalmente;
- Analisar, através de pesquisa de *Expressed Sequence Tags* (EST) nos bancos de soja o perfil de expressão dessa proteína em diferentes partes da planta;
- Avaliar, utilizando ferramentas de bioinformática, o perfil de expressão do gene de SBTX em plantas submetidas à infecção com fungos fitopatogênicos ou expostas a diferentes fatores abióticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sementes de Soja Utilizadas Para Plantio

Tal como descrito anteriormente, para a purificação e caracterização de SYTX-2, nesta etapa foram também utilizadas sementes de soja não tratadas com fungicidas provenientes da cultivar BRS – Pala e fornecidas pela Embrapa - Fundação Pró-sementes (Passo Fundo - RS). Para o plantio de soja em casa de vegetação e obtenção das sementes em diferentes estágios de maturação, foram utilizadas sementes livres de danos mecânicos e sem alterações morfológicas perceptíveis.

3.2 Isolamento, Clonagem e Caracterização do DNA complementar (cDNA) da Toxina da Soja - SBTX

3.2.1 Material Vegetal: Condições de Plantio

O plantio de soja foi realizado na casa de vegetação do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (Cenargen - EMBRAPA), mantida em temperatura de 25-28 °C e umidade atmosférica variável de 75 a 85%. As sementes foram semeadas em vasos de cerâmica, com capacidade para quatro litros de solo, sendo colocadas seis sementes por vaso, sendo deixadas apenas três plantas por vaso após o desbaste. A irrigação das plantas foi realizada em dias alternados e de forma manual. Para garantir a obtenção de plantas e sementes em diferentes estágios vegetativos e reprodutivos, as sementes foram plantadas em cinco datas distintas, distribuídas em intervalos de uma semana entre cada plantio e o subsequente (**Figura 01**).



Figura 01. Imagens da casa de vegetação (A) do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (Cenargen - Brasília), onde foi realizado o plantio de soja. Em “B” e “C”, plantas de soja em diferentes etapas do desenvolvimento usadas para obtenção de sementes e extração de RNA.

3.2.2 Coleta de Sementes e Extração de RNA Total

Para obtenção de RNA total e síntese de cDNA foram utilizadas sementes de soja coletadas 15, 25 e 35 dias após a antese (DAA - **Figura 02**). Os intervalos de coleta anteriormente citados correspondem, respectivamente, às fases: morfogênica tardia (até duas semanas após o florescimento), de divisão celular (de 3 a 4 semanas após o florescimento) e à fase de expansão celular (5 a 6 semanas após o florescimento) (HAJDUCH *et al.*, 2005).

Para extração de RNA as sementes foram coletadas e mantidas em nitrogênio líquido. Com auxílio de almofariz e pistilo, o material vegetal foi macerado e a ele adicionado o reagente “*Concert Plant Reagent*” (Invitrogen®), na proporção de 0,5 mL de reagente para cada 0,03 g de tecido. Em seguida, essa suspensão foi centrifugada (12.000 x g, 5 minutos, a 4°C) e o sobrenadante coletado, utilizado nas demais etapas do processo de extração de RNA que incluíram: adição de clorofórmio (2:1); homogeneização e repouso durante 5 minutos e precipitação do RNA íntegro com isopropanol (1:1). O RNA precipitado foi lavado com etanol 75%, e por fim, ressuspendido em água grau Milli-Q® tratada previamente com DEPC (dietil-pirocarbonato). A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (Biophotometer-Eppendorf®), através de medida das absorbâncias das preparações a 260 nm, utilizando como valor padrão 1 OD₂₆₀ = 40 µg/mL de RNA. A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), preparado com água grau Milli-Q® estéril. Após a corrida eletroforética, as bandas foram visualizadas através do uso de brometo de etídeo (0,01 ng/µL), sob luz ultravioleta em câmara escura equipada com um transluminador (*Gel Transilluminator Bio-Rad*) e uma câmera acoplada a um microcomputador dotado de um *software* de captura e análise de imagens em tempo real. Após análise, as amostras foram armazenadas a - 80 °C, até a utilização para obtenção de cDNA.

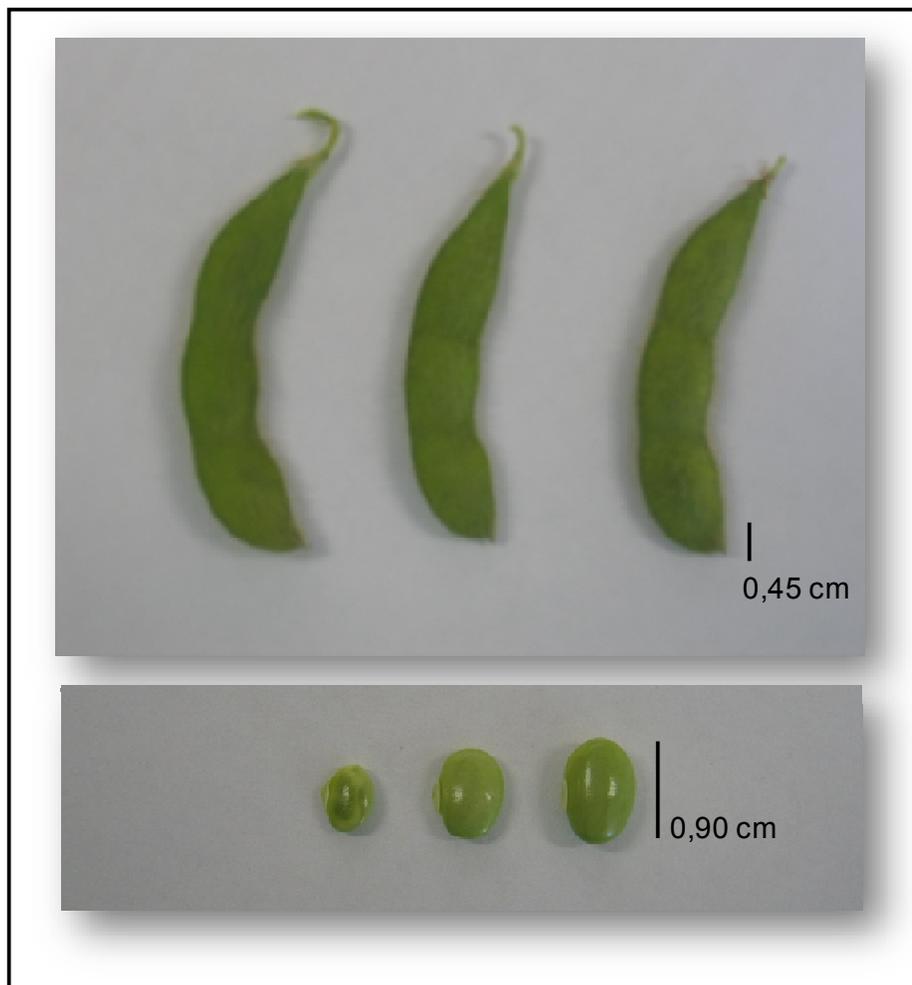


Figura 02. Vagens e sementes de soja nos tempos de 15, 25 e 35 dias (da esquerda para a direita) após a antese (cv BRS-Pala). As sementes foram usadas para extração de RNA total e obtenção de cDNA.

3.2.3 Síntese e Clonagem de cDNA – RT-PCR

A reação de RT-PCR (síntese de cDNA sobre um molde de RNA catalisada pela transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR, reação em cadeia de polimerase) foi realizada utilizando uma amostra de RNA proveniente de um *pool* de RNA total (produzido a partir de quantidades iguais de RNA extraído de sementes de soja coletadas nos intervalos de tempo mencionados) e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *forward* e *reverse* (Invitrogen®) degenerados e não degenerados, desenhados a partir da seqüência de aminoácidos NH₂-terminal da SBTX (Vasconcelos *et al.*, 2008) – **Tabela 01**. Nesse protocolo, a síntese de cDNA foi efetuada a partir de uma alíquota contendo 3 µg de RNA total, utilizando-se 10 µM de *oligo d(T) - anchor primer*, tampão de síntese de cDNA (Tris/HCl 250 mM, pH 8,5; KCl 150 mM; MgCl₂ 40 mM e ditiotreitol 100 mM), mistura de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), com concentração de 10 mM cada, e transcriptase reversa (200 U/µL) - MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* - Invitrogen®). As amostras de RNA foram pré-desnaturadas a 70 °C/10 minutos e mantidas em banho de gelo até a adição dos reagentes. A síntese do cDNA foi realizada a 42 °C/60 minutos com posterior inativação da enzima a 70 °C/15 minutos, segundo protocolo descrito pelo fabricante da transcriptase reversa.

A PCR foi realizada em termociclador (*Mastercycler Gradient Thermocycler* - Eppendorf®), em volume total de 25 µL contendo: 1 µL de cDNA obtido anteriormente; 2,5 µL de tampão (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM); mistura de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP- 400 µM, no volume final da reação, cada); 2 mM de MgCl₂; *Taq* DNA Polimerase – Alta fidelidade 2 U (Invitrogen®), água grau Milli-Q® estéril e iniciadores senso e antisense (0,4 µM) nas seguintes combinações: 1: SBTX 27F1 e oligo-d(T) -AP; 2 – SBTX 27F1 e SBTX 17R1; 3 – SBTX 27F1 e *primer* AP; 4 – SBTX 17F1 e oligo-d(T) –AP e SBTX 17 F1 e *primer* AP. Os iniciadores degenerados foram também testados nas mesmas combinações.

Tabela 01. Iniciadores utilizados para obtenção do cDNA da toxina da soja. Em destaque, são mostradas as sequências do NH₂-terminal das cadeias polipeptídicas de 27 kDa e 17 kDa determinadas para a SBTX. Os aminoácidos em azul foram usados para desenho dos *primers* não degenerados. Os aminoácidos grifados foram usados para desenho dos iniciadores degenerados

SBTX – NH₂-Terminal (Vasconcelos <i>et al.</i>, 2008)	
SBTX 44 e 27 kDa	SBTX 17 kDa
ADPT <u>FGFTPLGLSEKANLQIMKAYD</u>	PNPK <u>VFFDMTIG</u> QQSAGRIVMEEYA
Iniciadores	
SBTX 27F1^a (25 pb)	SBTX 17 F1 (25 pb)
5' CTT TTG GAT TTA CTC CTT TGG GTT T 3'	5' GGT TTT TTT TGA TAT GAC TAT TGG T 3'
SBTX 27F2 (24 pb)	SBTX 17 F2 (24 pb)
5' CCHYTN GGN YTN WSH GAR AAR GCH 3'	5' GCH GGN MGN ATH GTN ATG GAR GAR 3'
Oligo d(T) – AP	SBTX 17 R1 (25 pb)
5' GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C(T) ₁₆ 3'	5' ACC AAT AGT CAT ATC AAA AAA AAC C 3'
Primer AP	SBTX 17 R2 (24 pb)
5' GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C 3'	5' YTC YTC CAT NAC DAT NCK NCC DGC 3'

^a Os iniciadores indicados pelo número “1” não foram degenerados, ao passo que o número “2” indica *primers* degenerados. F e R indicam: *Foward* (senso) e *Reverse* (Anti-Senso).

*As propriedades físico-químicas e características de desempenho desses *primers* foram analisadas com o auxílio do programa OligoTech.

A princípio, as condições utilizadas para amplificação do cDNA de SBTX foram (em todas as combinações de *primers*): 94 °C por 1 minuto (pré-desnaturação) e 30 ciclos de 94 °C por 40 segundos (desnaturação), 55 °C por 40 segundos (anelamento) e 72 °C por 40 segundos (extensão), seguidos por uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Com o objetivo de otimizar as condições de amplificação do cDNA de SBTX as combinações de *primers* citadas anteriormente foram também testadas em condições de anelamento em gradiente de temperatura de 35 °C a 52,8 °C, tendo sido mantidos constantes os demais parâmetros da PCR.

Os produtos de amplificação obtidos nas reações de PCR utilizando os *primers* para SBTX foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE, submetido a uma voltagem de 4 V/cm, tendo como marcador de massa molecular 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen®). As amostras e o marcador de massa molecular foram solubilizados em tampão de amostra, contendo azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol - FF 0,25% e glicerol 30%, e as bandas foram visualizadas por meio do uso de brometo de etídeo (0,01 ng/μL) sob luz ultravioleta.

Em seguida, os fragmentos de interesse foram purificados a partir do gel de agarose, utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN®), de acordo com as orientações do fabricante. Após purificação, a concentração de DNA extraído foi estimada pela absorbância a 260 nm.

3.2.4 Ligação dos Fragmentos de DNA a Vetores de Clonagem e Transformação de Células Competentes de *Escherichia coli*

Para clonagem dos fragmentos amplificados e purificados do gel, o DNA foi solubilizado em água grau Milli-Q® estéril e incubado com o vetor pGEM-T Easy (**Figura 03**), em um meio contendo tampão de ligação e T4-DNA ligase (Promega®). Essa mistura foi incubada por 16 horas, a 4 °C. Os produtos de ligação foram, subsequentemente, utilizados para transformar células competentes (XL1-Blue) de *E. coli*, através do processo de eletroporação (SAMBROOK *et al.*, 2001) em microcélulas de polipropileno (*Gene Pulser Cuvette* - Bio-Rad®).

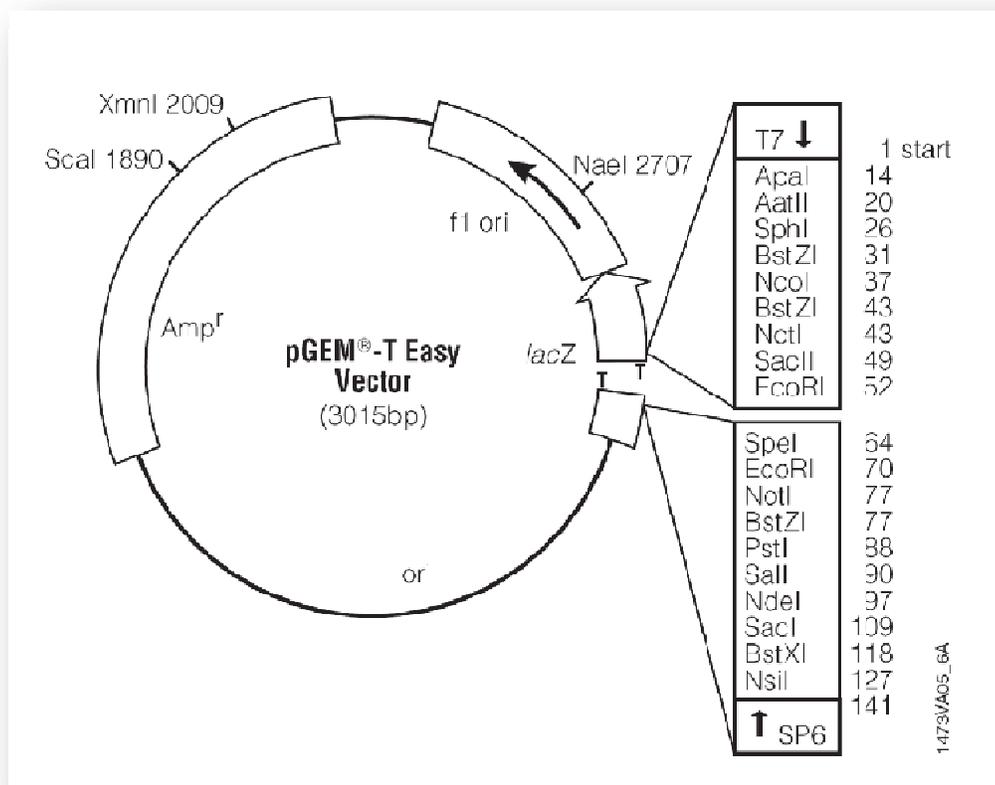


Figura 03. Mapa circular do vetor de clonagem pGEM-TEasy, com destaque para os diferentes sítios de restrição de endonucleases, gene de resistência à ampicilina e gene *lac Z* que codifica a enzima β – galactosidase. As características presentes na construção do vetor foram exploradas em várias etapas do processo de clonagem.

Após o processo de transformação, as células recombinantes foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido, por 1 hora, a 37 °C e, em seguida, em meio LB sólido (para seleção dos clones recombinantes) contendo 100 µg/mL de ampicilina, 50 µL de X-Gal 25 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosídeo) e 10 µL de isopropil-tio-galactosídeo 100 mM (IPTG - para indução da expressão do gene da β-galactosidase), por 24 horas, a 37 °C. Os plasmídeos dos clones contendo o DNA de interesse (brancos) foram isolados, utilizando-se o sistema de purificação da Life Technologies® (*Concert Rapid Plasmid Miniprep System*) e, posteriormente, usados para sequenciamento do inserto. Antes de serem submetidos ao sequenciamento automatizado de DNA, amostras de cerca de 30 µg dos plasmídeos provenientes das colônias brancas foram submetidas à digestão por 3 horas a 37 °C com EcoRI 2,5 U (Promega®) em tampão de digestão. Terminado o processo de digestão, os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, tal como descrito anteriormente. Foram submetidos ao sequenciamento somente os clones com digestão positiva (contendo o fragmento usado na ligação).

3.2.5 Sequenciamento de DNA e Análise das Sequências por Bioinformática

O sequenciamento das moléculas de DNA, isoladas a partir dos clones positivos de *E. coli*, foi efetuado no Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia Molecular da Universidade Católica de Brasília, utilizando o sistema de sequenciamento automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* e o kit *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems®). Para análise das sequências de DNA obtidas foram utilizados os softwares *Chromas* e *BioEdit 4.8*. O alinhamento e a determinação da homologia das seqüências com àquelas depositadas no *GenBank* foram realizados por meio do pacote de algoritmos de busca BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; ALTSCHUL *et al.*, 1990). Outros recursos de bioinformática disponíveis nos sítios NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), *Expasy Molecular Biology Server* e *CLUSTAL W. Softwares* também foram utilizados para caracterização *in silico* da seqüência de aminoácidos obtida para a toxina, bem como para estudo dos níveis de expressão da proteína em diferentes partes do vegetal, sob

condições diversas. Todos os parâmetros definidos através de ferramentas de bioinformática foram comparados àqueles obtidos experimentalmente para a proteína em estudo.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e Clonagem do cDNA da Toxina da Soja (SBTX)

Conforme descrito anteriormente, a SBTX é uma proteína de massa molecular aparente 44 kDa, composta por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto. Embora seja uma proteína que, através de técnicas imunológicas, tenha sido detectada em outras partes do vegetal (SIEBRA, 2004), sua fonte principal é, na verdade, o cotilédone de soja. Dessa forma, com o objetivo de isolar e clonar o cDNA codificante de SBTX, as sementes dessa espécie foram utilizadas como fonte de RNA para a síntese de cDNA.

Sementes da cultivar BRS-Pala foram plantadas em casa de vegetação sob condições ótimas de plantio no que diz respeito à temperatura (25 °C), umidade atmosférica (mantida sempre em torno de 70%), pH do solo (5,5) e irrigação periódica de forma manual, objetivando atender as necessidades fisiológicas dessa espécie (que variam de 400 a 800 mm de água/ciclo) e evitar a ocorrência de estresses que pudessem prejudicar seu desenvolvimento normal. Assim, características do ciclo biológico da cultivar BRS - PALA, como tempo para abertura das flores e altura média das plantas foram usados como parâmetros para a coleta de sementes, tendo sido retiradas apenas aquelas que atingiram os parâmetros esperados para a cultivar, divulgados pela EMBRAPA.

A coleta das sementes utilizadas para extração de RNA foi determinada a partir da abertura das flores da planta (antese) em intervalos de dias. Experimentalmente, foi determinado que, para a cv. BRS-Pala o tempo médio para abertura das flores foi de 37 ± 1 dias após o plantio, um ciclo de total de 118 a 125 dias e as plantas apresentaram, quando adultas, uma altura de 49 cm. As sementes foram retiradas 15, 25 e 35 dias após a antese, medidas e pesadas para

estimativa do peso fresco total. Sementes com 15 dias apresentaram massa total de 30 mg, havendo um incremento do peso fresco em 25 (80 mg) e 35 dias (140 mg) após a antese. Os intervalos de coleta da semente foram assim definidos com o objetivo de extrair RNA de diferentes fases do enchimento do grão, maximizando, portanto, a obtenção de transcritos para a proteína de interesse.

A partir das sementes obtidas foi realizada a extração de RNA total, seguindo a metodologia descrita anteriormente, quantificação e análise de integridade e pureza do material extraído. Cerca de 2.840, 1.670 e 3.730 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA foram extraídos de sementes com 15, 25 e 35 DAA, respectivamente, os quais apresentaram razão A260/A280 de 1,88, indicando seu elevado grau de pureza. A **Figura 04** mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos RNAs extraídos nos intervalos citados, destacando a presença de duas bandas principais correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a primeira banda mais intensa do que a segunda, demonstrando também que o RNA extraído estava livre de degradação.

O RNA extraído foi, então, utilizado para obtenção da primeira fita de cDNA. O cDNA obtido foi submetido à reação em cadeia de polimerase com os *primers* senso e antisenso para a β -actina, com o objetivo de testar a qualidade do cDNA produzido, antes dos procedimentos de isolamento de cDNA da SBTX. A amplificação da segunda fita de DNA a partir de amostras não diluídas de cDNA, usando os *primers* específicos para a actina, mostrou a ocorrência de uma banda de 400 pb demonstrando a qualidade do cDNA a ser usado na clonagem.

A clonagem do cDNA de SBTX foi realizada, inicialmente, partindo-se de condições padrão de PCR, descritas na literatura. O cDNA não foi diluído para uso nas reações e a temperatura de anelamento inicial foi de 55 °C. Não foram amplificados fragmentos de DNA nessas condições de reação quando utilizados *primers* degenerados ou não degenerados para as cadeias polipeptídicas de SBTX em diferentes combinações possíveis ou ainda, juntamente com os *primers* oligo-dT - AP e AP. Dessa forma, novas condições de PCR foram testadas utilizando temperaturas de anelamento mais baixas e de: 52,8; 51,8; 39,9; 37,3 e 35 °C.

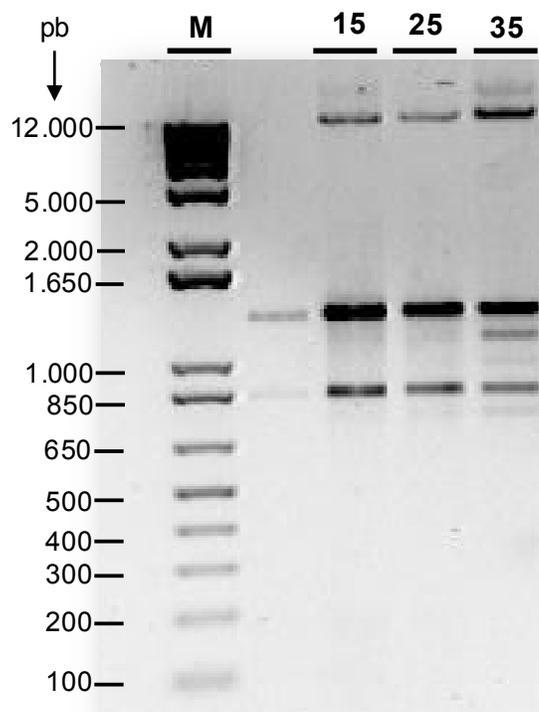


Figura 04. Eletroforese em gel de agarose 1% do RNA extraído de sementes de soja em diferentes estágios de maturação. As bandas foram visualizadas através de brometo de etídeo (0,01 ng/ μ L) sob luz ultravioleta. Raia M - marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen®). Raias 15, 25 e 35 indicam amostras de RNA nos respectivos intervalos de coleta em dias após a antese.

Para as novas temperaturas de anelamento testadas foram conduzidas duas reações de PCR. Na primeira, os *primers* 27F1 e Oligo d(T) – AP, 27F1 e AP, 27F1 e 17R1, 17F1 e Oligo d(T) – AP ou 17F1 juntamente com o primer AP foram utilizados para amplificação, sendo as mesmas combinações testadas para os *primers* degenerados. A segunda reação de PCR foi conduzida tal como as primeiras, mas utilizando 1 µL do DNA amplificado na primeira PCR como molde.

A análise em gel de agarose dos materiais provenientes de diferentes condições de amplificação mostrou que, apenas para a PCR conduzida com os *primers* 27F1 e AP houve amplificação de fragmentos de DNA em todas as temperaturas testadas (**Figura 05**). Nas temperaturas de 35, 37,3 e 39,9 °C foram obtidos fragmentos de DNA com tamanhos de aproximadamente 1400 e 430 pb, ao passo que nas temperaturas mais altas (51,8 e 52,8 °C) foram amplificadas bandas de tamanho superior a 2000 pb. Para a SBTX seriam esperados até três tamanhos de fragmentos possíveis: um fragmento em torno de 1320 pb que codificaria toda a cadeia polipeptídica de 44 kDa e fragmentos de aproximadamente 810 e 510 pb, codificantes das cadeias polipeptídicas de 27 kDa e 17 kDa, que fazem parte da proteína nativa. Dessa forma, considerando os tamanhos esperados, somente os fragmentos de 1400 e 430 pb foram utilizados nos passos seguintes de clonagem, sendo desprezadas as moléculas obtidas nas temperaturas maiores de 50 °C. Com o objetivo de se obter uma maior quantidade de DNA, a temperatura de 37,3 °C (segunda reação de PCR) foi escolhida para dar prosseguimento à clonagem das duas bandas obtidas.

Foram, então, realizadas oito reações de PCR nas condições já estabelecidas e ao final do processo, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para separação e purificação do DNA do gel. Para as bandas de 1400 e 430 pb foram obtidos, respectivamente, cerca de 98 ng/µL e 94 ng/µL de DNA, usados para inserção no vetor de clonagem pGEM-TEasy, produzindo o DNA recombinante que foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* (XL1-Blue).

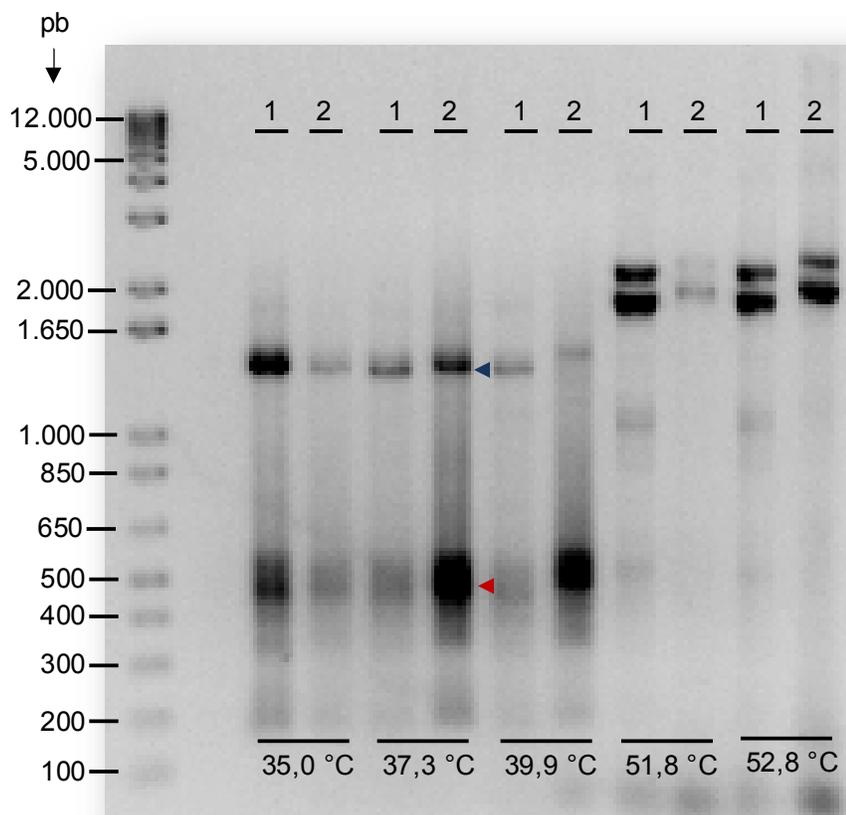


Figura 05. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos após amplificação com os *primers* SBTX 27F1 e AP em diferentes temperaturas de anelamento. As reações de PCR foram conduzidas nas temperaturas de anelamento indicadas na imagem. O número “1” indica primeira reação de PCR e 2 representa segunda reação de PCR usando como DNA molde material amplificado na primeira reação. Seta azul – banda ~ 1400 pb; Seta vermelha – banda ~ 430 pb; Raia M - marcador 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen®).

Os clones positivos foram primariamente identificados pela resistência ao antibiótico ampicilina (100 µg/mL) adicionado ao meio de crescimento bacteriano e colônias repicadas em placas com ampicilina contendo IPTG e X-Gal crescidas com a coloração branca foram consideradas potencialmente transformadas com o cDNA de interesse.

Para as células transformadas com o plasmídeo contendo o inserto de aproximadamente 1,4 kb foram obtidas 7 colônias. Para os plasmídeos contendo o fragmento de 0,4 kb foram obtidas 11 colônias representando clones positivos. Em seguida, as colônias brancas contendo os insertos foram repicadas em meio LB contendo ampicilina e deixadas crescer por 16 h, 37 °C, 200 rpm. As células bacterianas foram submetidas à extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina e o DNA obtido foi submetido à análise de restrição.

A **Figura 06** mostra o resultado do perfil de digestão dos clones selecionados. Para as colônias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto de 1,4 kb, das sete colônias selecionadas, apenas duas apresentaram o inserto como mostrado no resultado da digestão. Para as colônias transformadas com o fragmento de 0,4 kb, cinco clones apresentaram o inserto. Todos os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento automatizado de DNA usando amostras de DNA de 80 ng/µL e iniciadores T7 (*Foward*) e SP6 (*Reverse*).

A partir do seqüenciamento foi obtido um segmento de 1327 pb, correspondente ao material de aproximadamente 1,4 kb clonado em *E. coli*. Análises em BLASTn (NCBI) mostraram identidade de 100% das sequências obtidas com uma sequência (AK243932.1 e) depositada no banco de dados para a espécie *G. max*. A sequência completa de AK243932.1 possui 1492 pb e uma ORF que codifica uma proteína putativa de 378 resíduos de aminoácidos e massa molecular aproximada de 43 kDa, mas não possui em seu NH₂-Terminal nenhum resíduo de aminoácido obtido para as cadeias polipeptídicas de SBTX. Uma busca por similaridade através do algoritmo BLASTp mostrou que essa sequência é putativa para uma enzima de soja chamada de formato desidrogenase, que possui similaridade com várias outras sequências depositadas como aquelas de *Quercus robur* e *Lotus japonicus*, não se tratando, portanto do cDNA de SBTX.

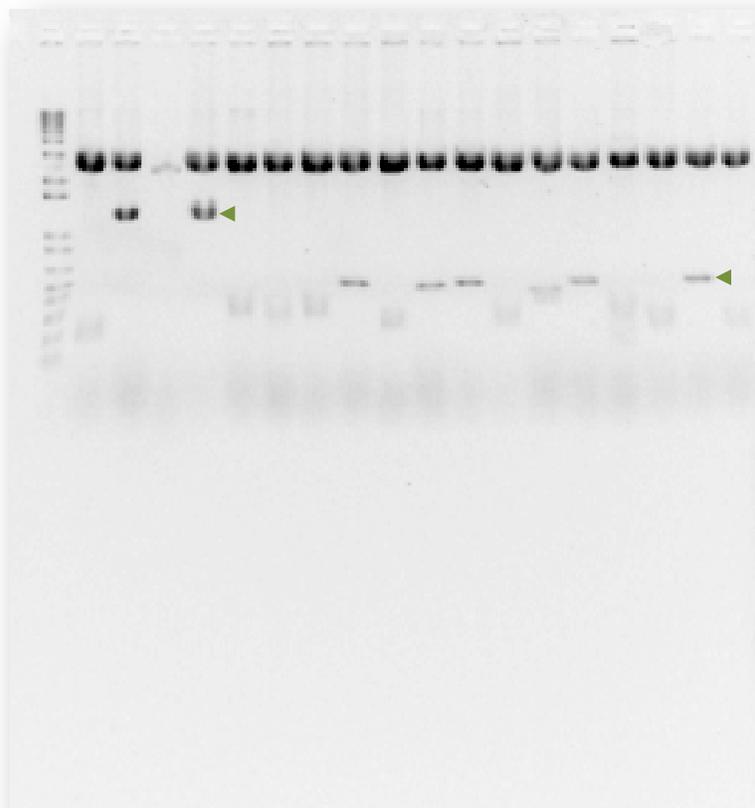


Figura 06. Análise de restrição dos plasmídeos provenientes de colônias brancas transformadas com os insertos de ~ 1400 pb e 430 pb. Trinta microgramas de DNA plasmidial foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI 2,5 U por 3 horas. As setas indicam os insertos de interesse.

Por outro lado, o seqüenciamento também forneceu um fragmento de 463 pb, contendo na extremidade 5' a sequência completa do *primer* 27F1 (não degenerado). A **Figura 07** mostra a sequência completa do fragmento de 0,4 kb juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida com o uso da ferramenta *Translate* (disponível em www.expasy.ch). Como pode ser observado, todos os resíduos de aminoácidos usados para o desenho do primer 27 F1 estão presentes na sequência deduzida, juntamente com outros resíduos presentes na cadeia polipeptídica. Em função de esses aminoácidos estarem presentes na subunidade de 27 kDa de SBTX, os dados sugerem fortemente que esse sequência é parte do cDNA da subunidade de 27 kDa da toxina da soja.

Para a soja estão depositadas atualmente mais de 1,7 milhões de sequências nucleotídicas nos bancos de dados do NCBI, além de informações referentes às EST's dessa espécie, como parte do estudo de seu genoma e transcriptoma. Considerando a riqueza de informações a respeito de sequências de nucleotídeos disponíveis para essa espécie, a sequência parcial de nucleotídeos encontrada experimentalmente (463 pb) foi utilizada para buscar a sequência completa da subunidade de 27 kDa através do alinhamento usando a ferramenta BLASTn.

A **Tabela 02** mostra três dos alinhamentos encontrados para a sequência parcial obtida para SBTX na base de dados do SoyBase (*Integrating Genetics and Molecular Biology for Soybean Researchers*). A busca foi realizada contra as sequências de EST's disponíveis para soja. Foram encontradas 29 sequências com escore máximo de alinhamento (e-value 0.0), dentre as quais podem ser citadas sequências provenientes de plantas infectadas com *Phytophthora sojae*, de tecidos do endosperma em desenvolvimento e de uma proteína ligante de grupamentos citrato, as quais, se alinhadas, mostram ser o mesmo material.

```

CTTTTGGATTACTCCTTTGGGTTTATCTAGTAGCTCAAACTTGCAAATCCAAAAGCCTTAC
  F G F T P L G L S S S S N L Q I Q K P Y
GACGTTGCAGTCAACGAGCGCTACAGCTTTTCAAATGGAGTGCACAGATTTTGGGTATAC
D V A V N E R Y S F S N G V H R F W V Y
TCCACGGACAAGCCTCATATGCAAGGCAGCAATACGAAGCCACGAACTGAGATTCGTATC
S T D K P H M Q G S N T K P R T E I R I
GCTGGATACGATTATACATCCGGTGTGTGGCAATTTCAAGGGTTTTTTTACGTGCCTAGT
A G Y D Y T S G V W Q F Q G F F Y V P S
GGCACAAGCGGGGTGTGCATCCAGCAAGTGTGGTGGAGTAACTTCTGCCACAACCTCG
G T S G V C I Q Q V F G G V T S A T T S
CAGACTAGGGTCTATGGTGGTTCTCTCACTCATTACCAATCACCTACTCTGGAACCAAAC
Q T R V Y G G S L T H Y Q S P T L E P N
ATCTATAATAGGTGGATCCGGTTTAACTGATCCATGATGTGGGTGCCAACAATGTGAAG
I Y N R W I R F N V I H D V G A N N V K
ATTTTTCTTAATGGGGAGGATAATCCCAGGTACAATGGACC
I F L N G E D N P R Y N G

```

Figura 07. Sequência de nucleotídeos de parte do cDNA de SBTX amplificado com os primers SBTX 27F1 e AP, juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida. O fragmento seqüenciado possui 463 pb. Em negrito está destacado o primer 27F1 desenhado para amplificação. Em azul, aminoácidos da região NH₂-terminal da subunidade de 27 kDa da SBTX.

Tabela 02. Alinhamentos encontrados para a sequência parcial do cDNA da subunidade de 27 kDa da SBTX utilizando o pacote de algoritmos de busca BLAST na base de dados do SoyBase (*Integrating Genetics and Molecular Biology for Soybean Researchers*). A busca foi realizada contra as sequências de EST's disponíveis para soja. Foram encontradas 29 sequências com escore máximo de alinhamento

Identificador	Identidade	Expect
> gb CF806952.1 CF806952 psHB017xO03f USDA-IFAFS:Expression of <i>Phytophthora sojae</i> genes during infection and propagation <i>Glycine max</i> cDNA clone sHB017O03 5, mRNA sequence	98%	0.0
> gb BQ740587.1 BQ740587 saq49c07.y1 Gm-c1076 Glycine max cDNA clone SOYBEAN CLONE ID: Gm-c1076-3181 5' similar to TR:Q39962 Q39962 CITRATE BINDING PROTEIN PRECURSOR. ;, mRNA sequence	98%	0.0
> gb EH039861.1 EH039861 GMSeed0669 Soybean endosperm tissue in developing seeds <i>Glycine max</i> cDNA clone HY118.xg_E10_072, mRNA sequence	98%	0.0

A **Figura 08** mostra o alinhamento da sequência parcial do cDNA encontrada para a toxina com uma das sequências nucleotídicas citadas anteriormente. Com base na alta identidade apresentada entre o cDNA parcial de SBTX e as sequências descritas, pode ser concluído que o cDNA encontrado é, na verdade, parte das sequências depositadas no banco de dados SoyBase, o que tornou possível definir as demais regiões da sequência de nucleotídeos para a cadeia polipeptídica de 27 kDa, obtendo-se assim o cDNA completo de uma das cadeias polipeptídicas da toxina.

O cDNA definido para a cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX, conforme visualizado na **Figura 09** é composto por uma sequência de 815 pares de bases, incluindo uma ORF de 660 nucleotídeos assinalada nas posições 15 a 674, a qual codifica uma cadeia polipeptídica de cerca de 219 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 24,570 kDa, valor esse próximo da massa molecular determinada experimentalmente para a cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX.

SBTX	-----	
SC24	TTGGAAGTGAACAATGGTGCCGCAACCCATTTTGCATCTAACCCCTTTTGTCAATTAATAA	60
SBTX	-----CTTTTGGATTTACTCCTT	18
SC24	TCTCTCTGACCACTCTTTCCTTGGTCGATGCCGCGATCCACATTTGGCTTCACCCCTC	120
	* * * * *	
SBTX	TGGGTTTATCTAGTAGCTCAAACCTTGCAAATCCAAAAGCCTTACGACGTTGCAGTCAACG	78
SC24	TTGGATTATCTAGTAGCTCAAACCTTGCAAATCCAAAAGCCTTACGACGTTGCAGTCAACG	180
	* * * * *	
SBTX	AGCGCTACAGCTTTTCAAATGGAGTGCACAGATTTGGGTATACTCCACGGACAAGCCTC	138
SC24	AGCGCTACAGCTTTTCAAATGGAGTGCACAGATTTGGGTATACTCCACGGACAAGCCTC	240
	* * * * *	
SBTX	ATATGCAAGGCAGCAATACGAAGCCACGAACTGAGATTCGTATCGCTGGATACGATTATA	198
SC24	ATATGCAAGGCAGCAATACGAAGCCACGAACTGAGATTCGTATCGCTGGATACGATTATA	300
	* * * * *	
SBTX	CATCCGGTGTGTGGCAATTTCAAGGGTTTTTTTACGTGCCTAGTGGCACAAGCGGGGTGT	258
SC24	CATCCGGTGTGTGGCAATTTCAAGGGTTTTTTTACGTGCCTAGTGGCACAAGCGGGGTGT	360
	* * * * *	
SBTX	GCATCCAGCAAGTGTGGTGGAGTAACTTCTGCCACAACCTCGCAGACTAGGGTCTATG	318
SC24	GCATCCAGCAAGTGTGGTGGAGTAACTTCTGCCACAACCTCGCAGACTAGGGTCTATG	420
	* * * * *	
SBTX	GTGGTCTCTCACTCATTACCAATCACCTACTCTGGAACCAAACATCTATAATAGGTGGA	378
SC24	GTGGTCTCTCACTCATTACCAATCACCTACTCTGGAACCAAACATCTATAATAGGTGGA	480
	* * * * *	
SBTX	TCCGGTTTAAACGTGATCCATGATGTGGGTGCCAACAAATGTGAAGATTTTCTTAATGGGG	438
SC24	TCCGGTTTAAACGTGATCCATGATGTGGGTGCCAACAAATGTGAAGATTTTCTTAATGGGG	540
	* * * * *	
SBTX	AGGATAATCCAGGTACAATGGACC-----	463
SC24	AGGATAATCCAGGTACAATGGACCTGGCCGTGGAGCCAGCACTCACTACTTCAAGTTTG	600
	* * * * *	
SBTX	-----	
SC24	GGGTTTACGCACAGGATGGTGCTTCCAACCTACATGGAATCTCGTTGGAGGGATATCCAGA	660
SBTX	-----	
SC24	TTTTTAAAAAATAGAAATGCAGTGCTTTCCTTTCAGTTCAGGTCTTAATAACACAAGCA	720
SBTX	-----	
SC24	AAGAGCTTGTTTAGTTAACTATATATGACTCTGAATAATTTACTTGGACTGTGAGAAGCA	780
SBTX	-----	
SC24	CGGTTTACAAATAATATAACTCTTGTATTGTGTCT	815

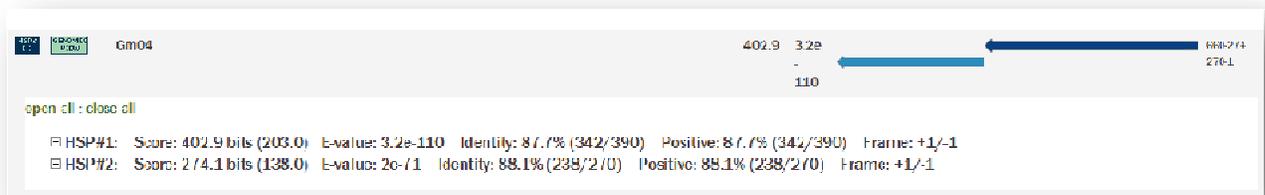
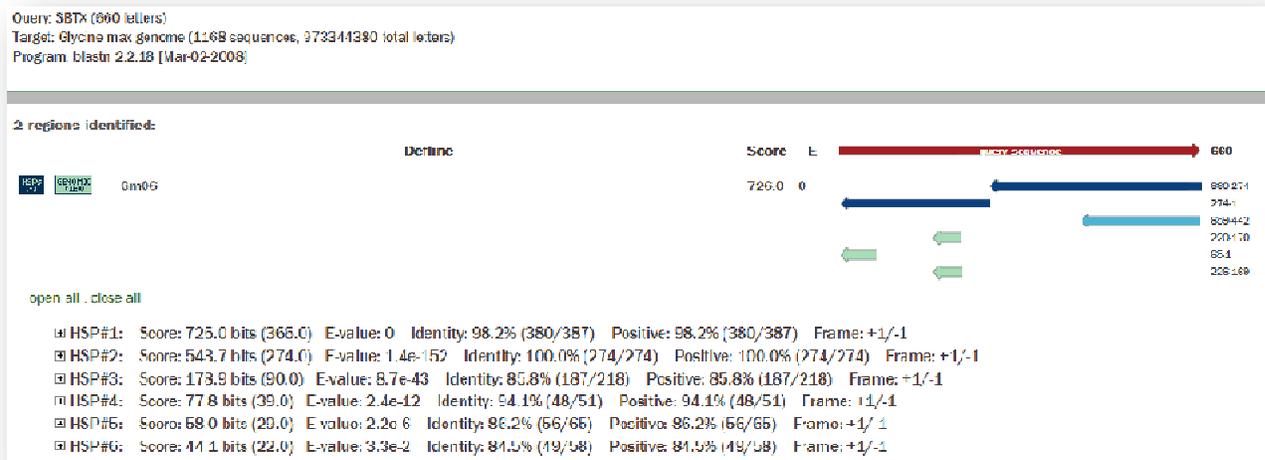
Figura 08. Alinhamento usando o programa Clustal W da sequência parcial do cDNA da subunidade de 27 kDa da SBTX com a sequência de RNAm disponível no NCBI para uma proteína ligante de carboxilatos de soja (SC24). Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos nas duas sequências.

Em adição aos dados já mostrados, uma pesquisa no banco de dados do genoma da soja divulgado recentemente (Dezembro/2008; www.phytozome.net) utilizando a ferramenta Blastn, tendo como entrada a sequência nucleotídeos (ORF) determinada para SBTX 27 kDa, mostrou que o genoma dessa espécie apresenta outras duas sequências gênicas completas (Gm04HSP e Gm06HSP). Essas sequências estão presentes nos cromossomos 04 e 06, respectivamente e mostram elevada identidade quando comparadas com a sequência de entrada, sugerindo que dois genes codificantes para a toxina estão presentes no genoma dessa espécie (**Tabela 03**).

Tabela 03. Alinhamentos encontrados para a sequência de cDNA da subunidade de 27 kDa da SBTX, utilizando o pacote de algoritmos BLASTn na base de dados do genoma da soja. A busca foi realizada utilizando como entrada a sequência de nucleotídeos codificante (660 pb) da cadeia polipeptídica de SBTX (ORF), que permitiu identificar outras sequências gênicas, cujos produtos apresentaram 85,3 e 95,6% de identidade com a subunidade de 27 kDa da SBTX. No esquema abaixo, são mostradas as posições das sequências encontradas em relação à sequência da SBTX

Identificador	Identidade % (positivos/alinhados)	Nucleotídeos alinhados	Expect
Gm04HSP#1	87,7 (342/390)	274-660	3,2e-110
Gm04HSP#2	88,1(238/270)	1- 274	2e-71
Gm06HSP#1	98,2% (380/387)	274 - 660	0
Gm06HSP#2	100% (274/274)	1 - 274	1,4e-152

Tabela 3 – Esquema geral de alinhamento da sequência de SBTX (ORF) com sequências nucleotídicas do genoma da soja



Com o objetivo estimar a expressão da sequência de cDNA em plantas de soja em diferentes condições, a sequência nucleotídica da cadeia de 27 kDa foi submetida à busca de sequências idênticas através da ferramenta Blastn contra o banco de EST's disponível para a soja. Nessa busca foram encontradas 69 EST's, detectadas em diferentes condições, algumas fisiológicas e outras (maioria) expressas em condições como infecção com patógenos, elicitação com produtos derivados da parede celular de fungos fitopatogênicos e, também, em plantas submetidas a estresses abióticos. Os dados para a frequência de EST's encontradas são mostrados (**Tabela 04** e **05**) em função do local e condição biológica de detecção, bem como em função das cópias dos genes detectados para a toxina.

Tabela 04. Frequência de EST's para a subunidade de 27 kDa da SBTX detectadas no banco de dados do NCBI, distribuídas em função dos genes definidos para essa proteína

Gene	Localização no genoma	EST's encontradas (n°/%)	Parte do vegetal de detecção mais frequente
Gm06HSP#1	Cromossomo 06	67/97	Cotilédones
Gm06HSP#2	Cromossomo 06	2/3	Cotilédones
Gm04HSP # 1 e 2	Cromossomo 04	0/0	-

Tabela 05. Frequência de EST's detectadas para a subunidade de 27 kDa da SBTX no banco de dados do NCBI. Os dados são mostrados como valores absolutos das EST's encontradas e em função das condições nas quais foram detectadas

Número de EST's	% do total	Local da planta	Condição experimental
29	43,8	Endosperma	40 dias após a floração
17	25,4	Cotilédones de plântulas	Tratados com glucano elicitor de <i>Phytophthora sojae</i>
2	3	Hipocótilo	48 h após infecção com <i>P. sojae</i>
1	1,4	Cotilédones em degeneração	Plântulas estioladas 9-10 dias
3	4,4	Hipocótilo, plúmula e sementes	Sementes em germinação
1	1,4	Tecidos adultos	-
2	3	Plântulas	Infectadas com <i>F. virguliforme</i> (folhas e hipocótilo) 1, 6, 24 e 48 h após inoculação
1	1,4		Estresse pelo frio: 4°C durante 2 dias
1	1,4	Plântulas	Idade de 3 semanas, mantida em casa de vegetação
2	3	Hipocótilos	Infectados com <i>P. sojae</i> e estiolados
2	3	Folhas	Estresse com radiação UV-B, 5 dias
2	3	Folhas	Tratadas com ozônio
1	1,4	Folhas imaturas	Crescidas em campo
1	1,4	Desconhecida	Desconhecidas
2	3	Folhas e caules	Plântulas infectadas com <i>Pseudomonas</i> , estresse salino e estresse hídrico

4.2 Caracterização Físico-Química e Funcional de uma das Subunidades de SBTX com Base nos Dados Obtidos por Clonagem

De posse da sequência completa de aminoácidos e nucleotídeos definidos a partir da clonagem e sequenciamento do cDNA da subunidade de 27 kDa de SBTX, foram avaliados *in silico* diversos parâmetros físico-químicos atribuídos para a proteína, comparando-os, sempre que possível, com os dados experimentais já obtidos em nosso laboratório.

Tomando como referência os dados mostrados na **Figura 09**, alguns aspectos devem ser observados com relação à sequência de aminoácidos deduzida. Primeiramente, a sequência mostra os resíduos de aminoácidos da extremidade NH₂-terminal determinados para a subunidade de 27 kDa da SBTX, mas em posições mais internas da cadeia polipeptídica (resíduos destacados em vermelho). Dessa forma, os demais 26 resíduos de aminoácidos anteriores ao NH₂-terminal da molécula, poderiam representar um peptídeo sinal de endereçamento da proteína. Através do uso da ferramenta SignalP 3.0 (www.expasy.ch) foi identificado um sítio de clivagem para um peptídeo sinal entre os resíduos de aminoácidos 26 e 27 da cadeia polipeptídica (**Figura 10**).

A composição de aminoácidos da subunidade de 27 kDa da SBTX também mostra um resíduo de cisteína que está provavelmente envolvido na interação por pontes dissulfeto com a outra cadeia polipeptídica que constitui a proteína nativa de 44 kDa. Em adição, outras características determinadas *in silico* para a sequência de aminoácidos deduzida da subunidade de 27 kDa da SBTX também foram obtidas experimentalmente. A **Tabela 06** mostra que a massa molecular, ponto isoelétrico básico e percentual de cisteína na composição de aminoácidos da proteína total são parâmetros praticamente idênticos entre os valores teóricos e determinados em laboratório. Outras características bioquímicas também são mostradas, como número de resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica e número de resíduos ácidos e básicos.

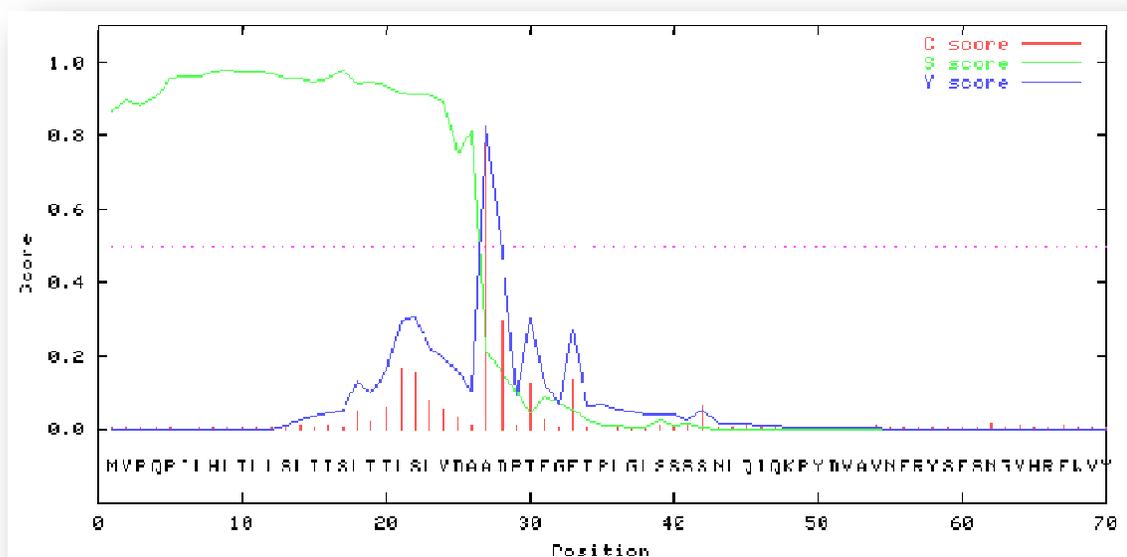


Figura 10. Diagrama da sequência NH₂-terminal da subunidade de 27 kDa da SBTX, mostrando sítios de clivagem preditos para a proteína na obtenção do peptídeo sinal. O sítio de clivagem mais provável está entre os aminoácidos 26 e 27, tal como observado no traçado do gráfico (linha vermelha de maior altura).

Tabela 06. Parâmetros físico-químicos determinados para a subunidade de 27 kDa da SBTX com base na sequência de aminoácidos deduzida. Os dados foram obtidos a partir de análise *in silico* usando a ferramenta *Compute pI/Mw*, disponível em www.expasy.ch. Em paralelo, são mostradas as características experimentais determinadas para a toxina da soja

^aResíduos de aminoácidos da proteína não processada.

Parâmetro	<i>In silico</i>	Experimental	Referência
Resíduos de aminoácidos	219 ^a 193 ^b	-	-
Massa Molecular	21,785 kDa	Espectrometria de massas: 21,604 kDa	Siebra, 2004
Ponto isoeletrico	9,3	8,4	Siebra, 2004
Asp + Glu	13	ND	-
Arg + Lys	18	ND	-
Cys	0,5 %	0,44%	Siebra, 2004

^bResíduos de aminoácidos da proteína processada.

A **Figura 11** mostra que na sequência de aminoácidos da subunidade de 27 kDa da SBTX, também podem ser identificados sítios de fosforilação e glicosilação. Foram preditos cerca de 06 resíduos de serina, 04 de tirosina e 01 de treonina potencialmente fosforilados. Também foi detectada uma região na sequência – QSPTLEPN – contendo um resíduo de treonina como sítio para O-glicosilação com monossacarídeos tipo mucina (GaNAc), bem como foram preditos sítios (08) para glicosilação com GlcNAc.

10	20	30	40	50	60
ADPTFGFTPL	GLSSSNLQI	QKPYDVAVNE	RYSF SNGVHR	FWVYSTDKPH	MQGSNTKPRT
70	80	90	100	110	120
EIRIAGYDYT	SGVWQFQGF	YVPSGTSGVC	IQQVFGGVTS	ATT SQTRVYG	GSLTHYQSPT
130	140	150	160	170	180
LEPNIYNRWI	RFNVIHDVGA	NNVKIFLNGE	DNPRYNGPGR	GASTHYFKFG	VYAQDGASNY
190					
MESRWRDIQI	FKK				

Figura 11. Potenciais sítios de fosforilação em resíduos de serina (amarelo), treonina (azul) e tirosina (verde) e determinação de resíduos de aminoácidos passíveis de glicosilação, preditos na sequência de aminoácidos da subunidade de 27 kDa da SBTX através do uso das ferramentas *NetPhos 2.0 Server* e *OGPet 1.0*, disponível em www.expasy.ch. A região destacada em vermelho contém um resíduo de treonina possivelmente O-GaNAc-glicosilado. Os resíduos destacados de cinza são sítios preditos para O-glicosilação com GlcNAc, sendo os resíduos Thr99, Ser100 e Thr106 sítios com maior escore para essa glicosilação (Ferramenta YinOYANG 1.2).

A toxicidade atribuída à SBTX foi verificada experimentalmente com o uso de camundongos. Essa proteína se mostrou tóxica apenas pelas vias endovenosa e intraperitoneal, mas não pela via oral. *In silico* foi verificado que a subunidade de 27 kDa da SBTX apresenta vários sítios de clivagem para proteases tipo catepsina, como pepsina (48 sítios), e proteinases serínicas, como tripsina (14 sítios) e quimiotripsina (30 sítios) (**Figuras 12, 13 e 14**).

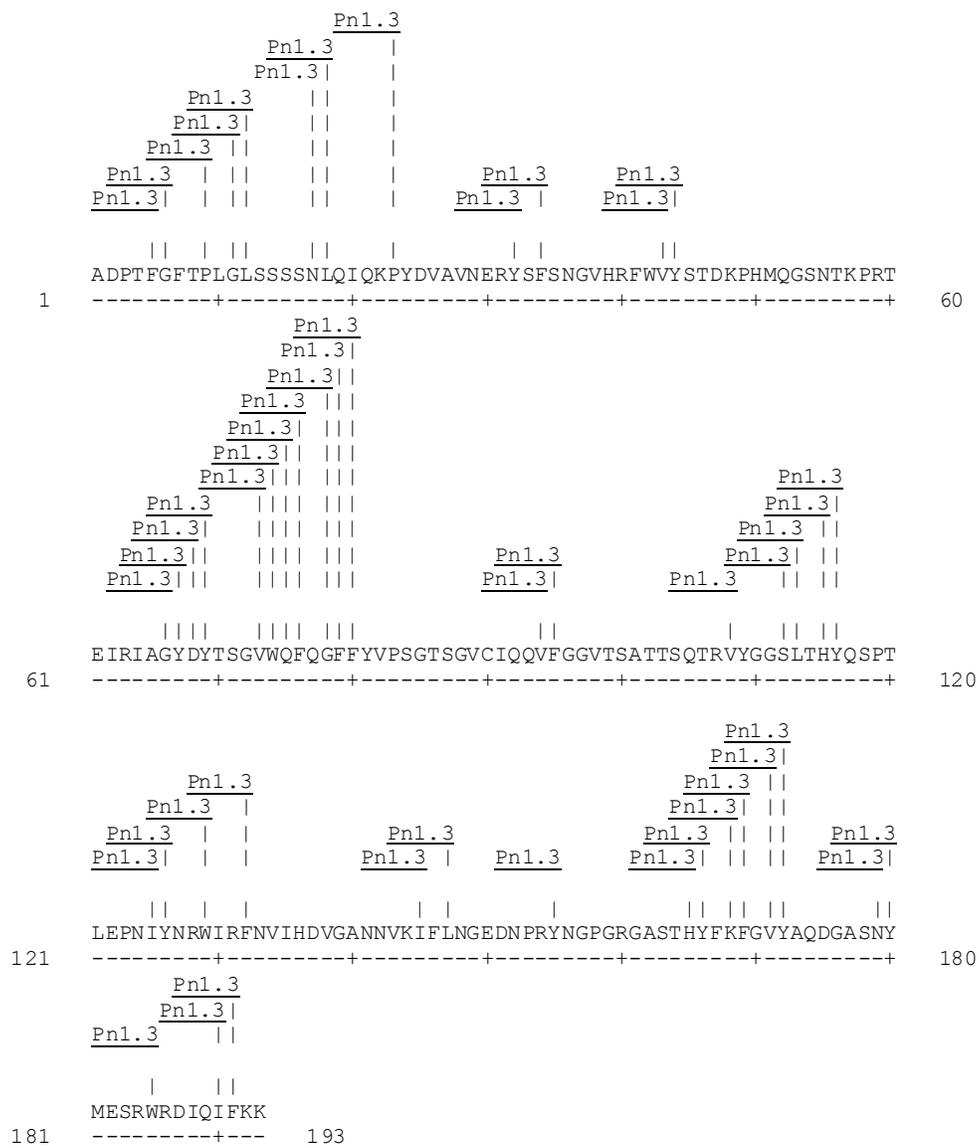


Figura 12. Sítios de clivagem da pepsina preditos na cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX. Quarenta e oito sítios de clivagem foram identificados na proteína, através do uso da ferramenta *PeptideCutter*, disponível em www.expasy.ch.



Figura 13. Sítios de clivagem da tripsina preditos na cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX. Catorze sítios de clivagem foram identificados na proteína utilizando a ferramenta *PeptideCutter* disponível em www.expasy.ch.

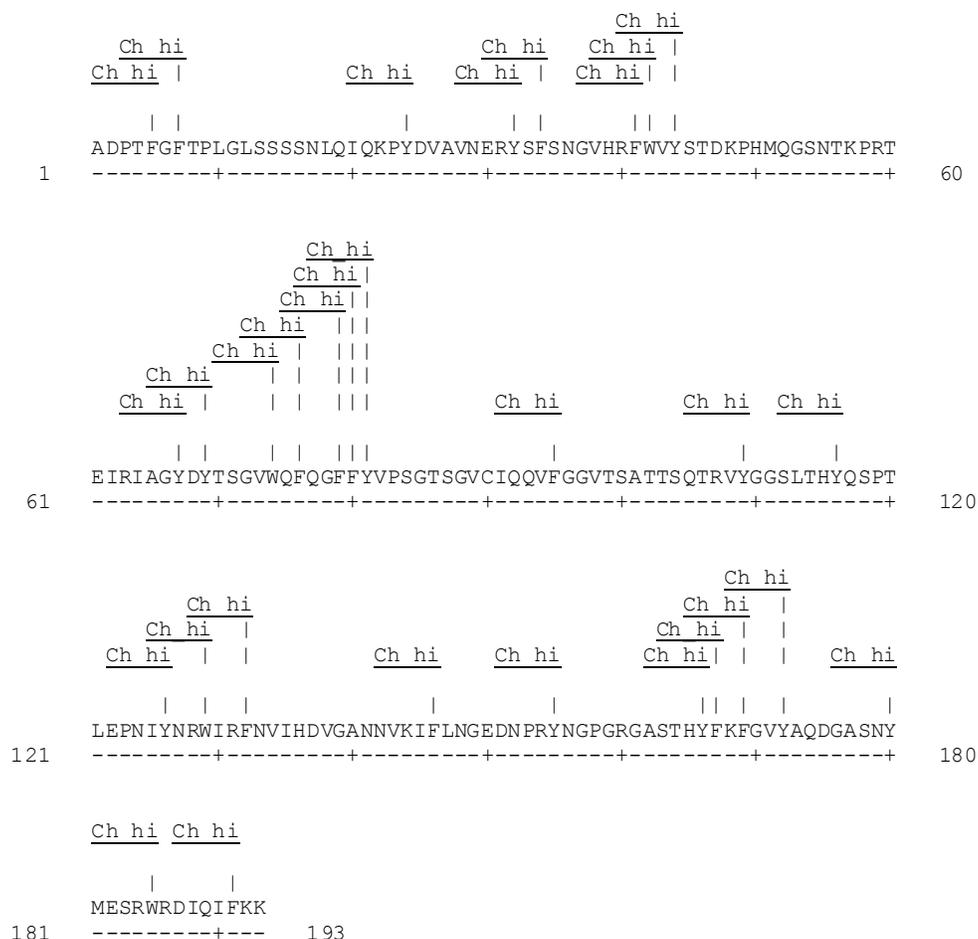


Figura 14. Sítios de clivagem da quimi tripsina preditos na cadeia polipeptídica de 27 kDa da SBTX. Trinta sítios de clivagem foram identificados na proteína utilizando a ferramenta *PeptideCutter* disponível em www.expasy.ch.

5. DISCUSSÃO

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária fornece, anualmente, dezenas de cultivares de soja destinadas ao plantio para os produtores de Estados como Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, sendo estes os maiores produtores nacionais de soja. Além do fornecimento de sementes, são também fornecidos alguns parâmetros a serem obtidos pela cultivar a ser utilizada, bem como informações acerca de reação a doenças e resistência a pragas.

Este capítulo descreveu o isolamento e a caracterização do cDNA de uma das cadeias polipeptídicas da toxina da soja a partir da cultivar BRS-Pala. Essa cultivar apresenta resistência contra a maior parte dos fungos de importância agrônômica para a soja, embora seja suscetível aos nematóides – de – galha (*M. incognita* e *M. javanica*), bem como à podridão vermelha da raiz (*F. solani* f.sp. *glycines*). Em casa de vegetação foram obtidas plantas com parâmetros biológicos semelhantes àqueles indicados pela Embrapa em relação à altura das plantas adultas (em torno de 60 cm), tempo para abertura das flores (em torno de 40 dias) e massa das sementes (1,54 g/100 sementes maduras).

A toxina da soja (SBTX) é uma proteína purificada de sementes secas e esse fato denota que a presença de transcritos para essa proteína seria mais facilmente detectada nos estágios finais do enchimento dos grãos. Entretanto, como não se conhecia o perfil de expressão do gene dessa proteína ao longo dessa fase, foram coletadas sementes de estágios iniciais e finais.

A etapa de clonagem do gene de SBTX foi realizada utilizando *primers* degenerados produzidos a partir do N-terminal das duas cadeias polipeptídicas presentes na proteína. Nas condições experimentais utilizadas não foram amplificados fragmentos de DNA para a subunidade de 17 kDa, em nenhuma das condições testadas. Além disso, não foram obtidas bandas amplificadas utilizando os *primers* 27F e 17 R, o que forneceu a evidência de que as duas cadeias polipeptídicas seriam codificadas por genes distintos e que a proteína madura (44 kDa) seria montada pós-traducionalmente. De fato, a clonagem utilizando o primer desenhado para a subunidade de 27F, forneceu apenas uma banda de tamanho abaixo (463 pb) do esperado (~810 pb), mas correspondente a parte do cDNA obtido para uma proteína

de massa molecular de 24,570 kDa, não obstante a mesma sequência N-terminal dessa subunidade tenha sido detectada na proteína de massa molecular de 44 kDa .

Sendo, portanto uma proteína codificada por dois genes esperar-se-ia que essas duas sequências fossem expressas ao mesmo tempo de modo a fornecer cadeias polipeptídicas para a produção de uma proteína madura de massa 44 kDa. Duas hipóteses experimentalmente já testadas para outras proteínas poderiam explicar a produção de SBTX madura a partir de dois genes.

Primeiramente, nos últimos anos, análises moleculares têm revelado padrões excepcionais de organização gênica em eucariotos. Isso inclui o caso de vários genes que são arranjados em várias unidades multicistrônicas expressas simultaneamente por um único promotor. Os pré-mRNA's seriam, então, processados por *splicing* alternativo a RNA's monocistrônicos, os quais, ao serem traduzidos, levariam à proteínas nativas e montadas. No nematóide *Caenorhabditis elegans* cerca de 25% dos genes parecem estar em unidades policistrônicas (KRAUSS e REUTER, 2000).

Por outro lado, em soja, os vários genes que codificam subunidades da proteína de reserva β -conglucina, estão dispostos e agrupados em várias regiões de DNA do genoma as quais são expressas no mesmo período de tempo. Para essa proteína de reserva presente nas sementes de soja, foram descritos dois mRNA's homólogos que diferem significativamente no tamanho (um de 2,5 kb e outro de 1,7 kb) e que codificam cadeias polipeptídicas de tamanhos também diferentes chamadas de α/α' e β as quais interagem para formar uma proteína trimérica cujas subunidades podem ainda sofrer modificações pós-traducionais que aumentam ainda mais a heterogeneidade dos produtos formados (THANH e SHIBASAKI, 1976 e 1978; BEACHY, JARVIS e BARTON, 1981; GOLDBERG *et al.*, 1981; SENGUPTA *et al.*, 1981; SCHULER *et al.*, 1982; COATES *et al.*, 1985 apud HARADA, BARKER e GOLDBERG, 1989, p. 415) .

Esses padrões de expressão gênica somente poderiam ser explicados em nossas condições, caso fosse obtida a sequência da subunidade de 17 kDa e definida a sua posição no genoma em relação à subunidade de 27 kDa e também em relação aos promotores que regulariam a sua produção, mas a simples existência de padrões de expressão como esses, já determinados experimentalmente inclusive em plantas de soja, mostra que é possível produzir proteínas de estrutura quaternária regulando a expressão de genes localizados em locais diferentes do genoma.

Tal como já descrito, a etapa experimental de clonagem do cDNA da subunidade de 27 kDa levou a obtenção da sua sequência parcial, a qual foi utilizada como ponto de partida para a busca das demais porções da mesma dentro das sequências de nucleotídeos já disponíveis para essa espécie. O alinhamento da sequência de nucleotídeos obtida mostrou identidade de 98% com outras sequências já disponíveis nos bancos de dados da soja e expressas em condições diferenciadas: uma delas em resposta à infecção com *P. sojae*, outra em endosperma em desenvolvimento e outra de uma proteína ligante de carboxilatos, todas elas correspondendo à mesma sequência. Esse dado permitiu determinar as demais regiões do cDNA necessárias para a obtenção da cadeia polipeptídica completa de SBTX 27 kDa.

A análise da sequência de nucleotídeos codante para SBTX 27 kDa, mostrou que sua cadeia polipeptídica é idêntica àquela determinada para a proteína chamada de SC24 (DHAUBHADEL *et al.*, 2005), inclusive com a presença de um peptídeo sinal, composto por 26 resíduos de aminoácidos, clivado para a obtenção da proteína madura.

O sequenciamento da extremidade N-Terminal de SBTX mostrou que, à exceção de cinco resíduos presentes no N-terminal da proteína processada, os outros 20 resíduos de aminoácidos são 100% idênticos. A diferença nesses resíduos de aminoácidos pode ser observada em função da cultivar utilizada neste trabalho. A literatura mostra que a presença de variantes de proteínas na soja é um evento que ocorre com diversas outras moléculas. A glicinina (*Glycine max*) é uma globulina 11S presente em sementes sintetizada a partir de um precursor único, pré-pró-glicinina, cujo peptídeo sinal é removido no retículo endoplasmático, produzindo as pró-glicininas, montadas em trímeros. Tem sido demonstrado que as glicininas obtidas de diferentes cultivares são proteínas altamente conservadas durante a evolução, mas as cadeias polipeptídicas que constituem essa molécula apresentam variantes que podem apresentar somente 45% de identidade a despeito de fazerem parte da mesma proteína (TUMER, THANH e NIELSEN, 1981; TUMER, RICHITER e NIELSEN, 1982; SCALON *et al.*, 1985; NIELSEN *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 2008). Quando a comparação é feita entre espécies do mesmo gênero a mesma condição é mostrada. Entre glicininas de *Glycine max* e *G. soja* foi observada uma identidade de 98% na sequência de nucleotídeos e 97% na sequência de aminoácidos (WENG *et al.*, 1995). Dessa forma, pode-se concluir que uma das subunidades de SBTX é, na verdade, uma proteína ligante de

carboxilatos. Dados experimentais obtidos por Siebra (2004) e Morais (2007), mostram que SBTX em pH 7,5 é capaz de se prender em matriz trocadora de cátions de CM-Sepharose, evidenciando a sua capacidade em interagir com grupamentos tipo ácido carboxílico.

O alinhamento do cDNA de SBTX 27kDa usando dados preliminares fornecidos pelo projeto Genoma da Soja, mostrou que existem pelo menos duas sequências no genoma dessa espécie com identidades de 87-88% e 98-100% presentes nos cromossomos 4 e 6 codantes para essa proteína, embora nos cromossomos 5, 8 e 12 também tenham sido observados regiões de elevada identidade, mas interrompidas por vários códons de parada. Sabe-se que a soja é um organismo que apresenta duplicações no seu genoma em função de eventos ocorridos ao longo da evolução. Dessa forma a presença de várias cópias de algumas proteínas não é um evento inesperado, já que 40-60% de seu genoma apresenta sequências repetidas (GOLDBERG, 1978; GURLEY *et al.*, 1979; SINGH e HYMOWITZ, 1988).

Usando estratégias simples baseadas em busca de similaridades usando sequências de EST's, diversos autores têm conseguido identificar vários genes com expressão diferencial entre órgãos, bem como em diferentes intervalos de tempo e ambientes, além de conseguirem informações acerca de seu mecanismo de regulação metabólica. Dentro desse contexto, o uso de EST's torna-se uma ferramenta extremamente valiosa, pois quando a busca por sequências é feita de forma randômica, o número de EST's encontradas acaba se tornando proporcional à expressão do gene em um dado tecido ou órgão (ADAMS *et al.*, 1991; ADAMS *et al.*, 1995; EWING *et al.*, 1999; SHOEMAKER *et al.*, 2002).

Utilizando a sequência de aminoácidos deduzida para SBTX 27 kDa e a ferramenta TBLASTN, foram detectadas 69 EST's, todas elas representando parte da sequência presente no cromossomo 06. Isso mostra que, pelo menos nas condições de obtenção das várias EST's, o gene presente no cromossomo 04 não é expresso. Através da análise da condição experimental, bem como do local onde essas EST's para SBTX 27 kDa foram detectadas, pode-se verificar que os maiores índices de expressão dessa proteína são observados nas sementes, mas essa proteína também se mostra expressa em folhas, caules, raízes, plântulas inteiras, cotilédones em degeneração e hipocótilos. Além disso, algumas EST's foram detectadas em plantas infectadas com fungos como *P. sojae*, *F. virguliforme* e bactérias do gênero

Pseudomonas, todos esses patógenos de importância econômica para a soja. *In vitro*, Vasconcelos e colaboradores (2008) e Moraes (2007) mostraram que SBTX purificada foi capaz de inibir o crescimento micelial de *Cercospora sojina* e das leveduras *C. albicans* e *Kluyveromyces marxianus*. Em conjunto, esses dados mostram que a SBTX é uma proteína que participa da defesa contra patógenos, sendo expressa em todas as partes do vegetal, embora as sementes apresentem o maior nível (50/69 EST's encontradas) de expressão para essa proteína. A detecção de SBTX em diferentes partes do vegetal também foi obtida experimentalmente por Siebra (2004). Utilizando plântulas germinadas no escuro e anticorpos policlonais produzidos contra SBTX, foi demonstrado que essa proteína pode ser detectada em raízes, caules, folhas e cotilédones de soja.

No Capítulo I foi mostrado que, em detrimento do grande volume de informações fornecidas pelo genoma, informações acerca da estrutura, localização e atividades biológicas apresentadas por proteínas são ferramentas de grande importância para o estudo e função dos genes. Dhaubhadel e colaboradores (2005) mostraram a descrição estrutural de uma proteína ligante de carboxilatos e sugeriram sua possível participação na defesa com base na elevação do número de transcritos em tecidos infectados com *P. sojiae* e submetidos à injúria mecânica. Os trabalhos realizados por Siebra (2004), Moraes (2007), Vasconcelos *et al.*(2008) juntamente com os dados apresentados neste capítulo são ainda mais relevantes, por fornecerem uma evidência mais detalhada da participação de SBTX na defesa contra fungos, bem como de sua caracterização bioquímica e distribuição tecidual.

Em adição a todos os dados experimentais já mostrados, a análise da sequência de aminoácidos deduzida para SBTX 27 kDa, mostrou que a proteína madura apresenta uma massa molecular de 21,7 kDa, sendo esse valor muito semelhante ao obtido (21,6 kDa) por espectrometria de massas para a subunidade de 27 kDa de SBTX também por SIEBRA (2004). A molécula de SBTX madura é uma proteína de massa molecular de 44 kDa sendo constituída por duas subunidades unidas por pontes dissulfeto. Na verdade, apenas uma ponte de sulfeto é responsável pela união covalente das cadeias polipeptídicas visto que apenas um resíduo de cisteína foi detectado em SBTX 27 kDa. Além disso, essa ponte parece estar inserida em regiões mais profundas da estrutura nativa da proteína visto que só foram rompidas quando a proteína foi incubada em presença de β -mercaptoetanol 5% durante 15 minutos. Outra evidência que reforça a

presença de uma ponte dissulfeto intramolecular no interior da estrutura tridimensional advém do fato de que, DTT 5 mM é um agente redutor adicionado em todas as etapas do protocolo de purificação de SBTX, mas a proteína de 44 kDa, e não suas subunidades separadas, é obtida ao final do processo de purificação.

A toxina da soja é purificada a partir de sementes inteiras de soja e, até então, não havia nenhuma evidência de sua localização em tecidos da casca das sementes de soja. No Capítulo 2 foi mostrado que o extrato total da casca de BRS-Pala não foi letal para camundongos após a sua obtenção, mas se tornou letal quando as proteínas desse extrato foram concentradas de modo a obtermos um valor de dosagem próximo à DL_{50} do extrato total. Anticorpos produzidos contra SC24 foram capazes de reconhecer uma proteína presente na casca de soja de massa molecular 43 kDa. Embora esse reconhecimento tenha sido atribuído à peroxidase da casca de soja, não pode ser descartado o fato de que SBTX também tenha sido reconhecida por esse anticorpo já que agora é sabido que a SC24 é uma das subunidades de SBTX.

Com relação ao ponto isoeletrico apresentado para SBTX, foi determinado experimentalmente que a proteína madura apresenta pI de 8,4, ao passo que o ponto isoeletrico teórico calculado para essa molécula foi de 9,3, mostrando que SBTX é uma proteína básica. Esse dado corrobora com o fato de que, em pH 7,5 SBTX não é capaz de se prender em matriz de DEAE-Celulose, mas é adsorvida em matriz de CM-Sepharose mostrando que nesse pH a proteína deve estar positivamente carregada, o que só é possível nessas condições para proteínas básicas. Agrawal e colaboradores (2008) demonstraram que as proteínas básicas de sementes de soja correspondem a 25-35% das proteínas detectadas, mostrando que proteínas ácidas são mais expressas em condições normais. Quando esse dado é colocado em função das toxinas presentes em sementes de soja, observa-se que SYTX-2, uma proteína de pI ácido (Capítulo II) apresenta um rendimento pouco mais de duas vezes maior do que aquele já definido para SBTX (30 mg/100 gF), corroborando com a análise proteômica anteriormente mostrada.

Utilizando as ferramentas *NetPhos 2.0 Server* e *OGPet 1.0* foram identificados 11 sítios potenciais de fosforilação na sequência de aminoácidos deduzida para SBTX 27 kDa, além de uma sequência contendo sítios para O-glicosilação com oligossacarídeos tipo mucina (GalNAc), bem como sítios para glicosilação com N-acetil-glicosamina. A predição de modificações pós-traducionais nessa proteína indica

que, *in vivo* a adição de fosfatos e glicanos podem ser os responsáveis pelas diferenças de *pI* teórico e experimental mostrados anteriormente. Dados experimentais (Siebra, 2004) também mostraram que SBTX é uma glicoproteína contendo 5% de carboidratos em sua composição, tal como mostrado inclusive para outras proteínas tóxicas como a lectina de *Ipomoea assariforia* (SANTOS, 2001), confirmando as informações obtidas pela análise *in silico* dessa molécula.

A toxicidade atribuída à toxina da soja foi verificada experimentalmente, mas ocorre somente quando frações contendo essa proteína são injetadas pela via intraperitoneal e/ou endovenosa de camundongos, não se mostrando, portanto, tóxica pela via oral. A ausência de toxicidade pela via oral sugere que, em mamíferos, seria digerida e, portanto, inativada proteoliticamente. A partir da sequência de aminoácidos deduzida para SBTX 27 kDa foi possível identificar sítios de reconhecimento para a protease aspártica pepsina e para as proteases serínicas tripsina e quimiotripsina.

Embora a toxicidade não tenha sido verificada pela via oral em mamíferos, SBTX foi capaz de exercer efeitos deletérios contra os insetos *Dysdercus peruvianus* e *C. maculatus*. Para *D. peruvianus* houve diminuição no peso médio apresentado, ao passo que para *C. maculatus* o tempo médio de desenvolvimento e o percentual de emergência foram os parâmetros mais alterados. Para outra neurotoxina, proveniente das sementes de *C. ensiformis* – CNTX, o efeito inseticida observado contra *D. peruvianus* e *C. maculatus* foi ocasionado devido à formação de um peptídeo entomotóxico de 10 kDa – Jaburetox-2Ec (MULINARI, 2007) após a digestão dessa proteína com proteases tipo catepsinas (aspárticas e cisteínicas), presentes no trato digestório desses insetos. O alinhamento da sequência completa de SBTX 27 kDa com a sequência do peptídeo entomotóxico Jaburetox-2Ec não forneceu alinhamento significativo de resíduos de aminoácidos, mostrando que, embora possa ser digerida por proteases aspárticas, o mecanismo de ação inseticida de SBTX não envolve a formação de peptídeos entomotóxicos CNTX-like a partir da subunidade de 27 kDa. Não obstante, esses dados não foram analisados para a subunidade de 17 kDa e é possível que outros mecanismos estejam envolvidos nesse efeito contra insetos-praga.

6. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

- A toxina da soja é uma glicoproteína que apresenta estrutura quaternária formada por duas cadeias de massas moleculares distintas unidas por uma ponte dissulfeto. Experimentalmente, foram obtidas evidências que sugerem que essas cadeias são codificadas por genes diferentes.
- A clonagem do cDNA da cadeia de 27 kDa mostrou que essa proteína é uma proteína básica idêntica a uma proteína ligante de carboxilatos isolada da casca da soja, mas não detectada até então nos cotilédones. Os dados obtidos com a análise *in silico* de SBTX foram corroborados com os dados experimentais já obtidos para essa proteína.
- A subunidade de 27 kDa da SBTX é codificada por genes presentes nos cromossomos 04 e 06 da soja, fato possivelmente relacionado às duplicações do genoma dessa espécie.
- A busca por EST's de SBTX mostrou que essa proteína está expressa principalmente nos cotilédones de sementes de soja, mas transcritos para essa proteína foram identificados em toda a parte da planta, particularmente em resposta a infecção com fungos fitopatogênicos e estresses abióticos. Esse dado sugere que SBTX é uma proteína que participa da defesa da planta contra fungos, tal como determinado para suas atividades *in vitro* contra *C. sojina* e *C. albicans*.
- A análise *in silico* mostrou que a sequência de aminoácidos deduzida para SBTX apresenta sítios potenciais de glicosilação. Experimentalmente foi determinado que SBTX apresenta cerca de 5% de carboidratos em sua estrutura.
- A ausência de toxicidade oral em camundongos atribuída a SBTX se deve ao fato de que essa proteína é digerida no trato digestório desses animais. *In silico* foram detectados vários sítios de hidrólise para pepsina, tripsina e quimiotripsina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Embora seja uma espécie de grande importância econômica, muitos dos aspectos biológicos da soja começaram a ser entendidos somente nos últimos dez anos. O surgimento de novos métodos de solubilização de proteínas, a construção de bibliotecas de sequências expressas e a exploração dos mecanismos de defesa vegetal foram ferramentas que impulsionaram todo o conhecimento que se tem hoje a respeito da soja. Todas essas técnicas surgiram, invariavelmente, da necessidade de se conhecer melhor os mecanismos envolvidos na defesa vegetal ou de vias metabólicas destinadas ao um melhor aproveitamento do potencial biológico apresentado por esta espécie.

Através dos trabalhos desenvolvidos nesta tese foram descritas duas proteínas isoladas inicialmente a partir de sementes de soja, cuja atividade tóxica contra camundongos foi usada para chamá-las de toxinas.

SYTX-2 foi mostrada não apenas como uma proteína tóxica, mas sim como uma proteína participante da defesa vegetal, presente em várias partes da planta e dotada de uma potente atividade nematicida. Para essa proteína também foram descritos detalhes físico-químicos que permitem justificar muitas das atividades apresentadas por essa molécula. Além de inéditos e de extrema relevância, todos esses dados darão subsídios para estudos posteriores que objetivem alterar os níveis de expressão dessa toxina para uma finalidade específica, além de impulsionar estudos acerca de sua microestrutura protéica e isolamento gênico.

A toxina da soja – SBTX – foi mostrada através de uma caracterização estrutural ainda mais completa e as informações obtidas permitiram definir que essa proteína é parte importante da defesa da soja contra fungos fitopatogênicos, contribuindo para a realização de projetos futuros, visando o desenvolvimento de plantas transgênicas com uma maior resistência a fungos. O cultivo de plantas geneticamente modificadas, mais resistentes a fungos, deverá resultar em uma redução na quantidade de defensivos agrícolas, com benefícios sociais, econômicos e ambientais, tendo em vista maior produção agrícola e, conseqüentemente, maior oferta de alimento e diminuição do impacto ambiental dos resíduos dessas substâncias.

Dessa forma, toda a pesquisa básica apresentada nesta tese, teve o papel de fornecer subsídios para a aplicação de conhecimentos importantes para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M. POLUMEROPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F.; KERLAVAGE, A.R.; MCCOMBIE, W.R.; VENTER, J.C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**. n. 252: 1651–1656, 1991.

ADAMS, M.; KERLAVAGE, A.; FLEISCHMANN, R. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**. n. 377: 163–174, 1995.

AGNOL, A. D. **Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja.** Disponível em:<www.agrolink.com.br/colunistas/> Acesso em: 17 de maio 2009.

AGRAWAL, G.K.; HAJDUCH, M.; GRAHAM, K.; THELEN, J.J. In-Depth Investigation of the Soybean Seed-Filling Proteome and Comparison with a Parallel Study of Rapeseed. **Plant Physiology**. vol. 148: 504–518, 2008.

AKEM, C. N., DASHIELL, K. E. Effect of planting date on severity of frog-eye leaf spot and grain yield of soybeans. **Crop Protection**. n. 13: 607 – 610, 1994.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**. n. 35: 1674–1681, 2003.

ALMEIDA, M. S.; CABRAL, K.M.; KURTENBACH, E.; ALMEIDA, F. C.; VALENTE A. P. Solution structure of *Pisum sativum* defensin-1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. **Journal of Molecular Biology**. n. 315:749 – 757, 2002.

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

AL-YAHYA, F. A. Lectin Binding to some development Stages of *M. incognita*. **Journal King Saud University Agriculture Science**. vol. 8. n. 2: 287-295, 1996.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reports**. n. 9: 208–219, 1991.

ATKINSON, H.J.; GREEN, J.; COWGILL, S.; LEVESLEY, A. The case for genetically modified crops with a poverty focus. **Trends in Biotechnology**. n. 19: 91–96, 2001.

BEACHY, R. N.; JARVIS, N. P.; BARTON, K. A. Biosynthesis of subunits of the soybean 7s storage protein. **Journal of Molecular Applied Genetics**. n. 1: 19-27, 1981.

BECERRA, J.; FLORES, C.; MENA, J.; AQUEVEQUE, P.; ALARCÓN, J.; BITTNER, M.; HERNÁNDEZ, V.; HOENEISEN, M.; RUIZ, E.; SILVA, M. Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**. n. 47: 151–157, 2002.

BENJAMIN, C.F.; FIGUEIREDO, R.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; BARJA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Resources**. n. 30: 873–881, 1997.

BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**. n. 38: 48–54, 1993.

BERTHOLDO-VARGAS, L.R.; MARTINS, J.N.; BORDIN, D.; SALVADOR, M.; SCHAFFER, A.E.; BARROS N.M.; BARBIERI, L.; STIRPE, F.; CARLINI, C.R. Type 1 ribosome-inactivating proteins—Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**. vol. 55. n. 1: 51-58, 2009.

BESLER, M.; HELM, R.M.; OGAWA T. Allergen data collection – update for soybean. **Internet symposium on food allergens**. vol. 2: 1–35, 2000.

BEVAN, M.; BANCROFT, I.; BENT, E.; LOVE, K. GOODMAN, H.; DEAN, C.; BERGKAMP, R.; DIRKSE, W.; VAN STAVEREN, M.; STIEKEMA, W. Analysis of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. **Nature**. n. 391: 485–488, 1998.

BIRD, D.M.; KALOSHIAN, I. Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n. 62: 115–123, 2003.

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

BOLAR, J. P.; NORELLI, J. L.; WONG, K. W.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E.; ALDWINCKLE, H. S. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. **Phytopathology**. n. 90: 72 – 77, 2000.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**. n. 218: 443–448, 1982.

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**. n. 72: 248-254, 1976.

BRANDO-LIMA, A.C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and Applied Pharmacology**. n. 208: 145–154, 2005.

BURTON, J. W. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**. n. 53:171 – 186, 1997.

C.O.B.E.A. (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) - Princípios éticos na experimentação animal. Congresso do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991.

CAI, D.; THURAU, T.; TIAN, Y.; LANGE, T.; YEH, K.; JUNG, C. Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. **Plant Molecular Biology**. n. 51: 839–849, 2003.

CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. Biological Spectroscopy. California: Benjamin Cummings Publish, 1984.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. Biophysical Chemistry, part II: techniques for the study of biological structure and function. NEW York: W. H. Freeman, 1980.

CAPELLARI - JÚNIOR, L.; RODRIGUES, R. R.; SOUSA, V. C. Apostila de Botânica Sistemática. Piracicaba: Departamento de Botânica, ESALQ/USP, 1999, 95p.

CAPORALE, C.; DI BERARDINO, I.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; CASCONI, A.; BUONOCORE, V.; CARUSO, C. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. **FEBS Letters**. n. **575**: 71–76, 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**. n. 19: 667 – 676, 1981.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; RIBEIRO, J.M. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. **British Journal of Pharmacology**. n. **84**: 551–560, 1985.

CARLINI, C.R.; GUIMARAES, J.A.; Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. **Toxicon**. n. 29: 791–806, 1991.

CARLINI, C.R.; OLIVEIRA, A.E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M.A. Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. **Journal of Economic Entomology**. n. **90**: 340–348, 1997.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**. n. 40: 515 – 539, 2002.

CARPENTIER, S.C.; PANIS, B.; VERTOMMEN, A., SWENNEN, R.; SERGEANT, K.; RENAUT, J. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. **Mass Spectrometry Reviews**. n. **27**: 354–377, 2008.

CARVALHO, A.O.; FILHO, G.A.S.; FERREIRA, B.S.; BRANCO, A.T.; -FAÇANHA O.; GOMES, V.M. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. **Protein Peptide Letters**. n. **13**: 1029–1036, 2006.

CARVALHO, A.O.; GOMES, V.M. Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**. vol. 30. n. 5: 1007-1020, 2009.

CHEN K. C.; LIN C. Y.; KUAN C. C.; SUNG H. Y.; CHEN C. S. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n.50:7258 – 7263, 2002.

CHEN, S.C.; LIU, A.R.; ZOU, Z.R. Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Russian Journal of Plant Physiology**. vol. **53** (5) (2006), pp. 671–677.

CHITWOOD, D.J. Research on plant–parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture—Agricultural Research Services. **Pest Management Science**. n. **59**: 748–753, 2003.

CLEMENTE, T.; LAVALLEE, B.; HOWE, A.; WARD, D.C.; ROZMAN, R.; HUNTER, P.; BROYLES, D.; KASTEN, D.; HINCHEE, M. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. **Crop Science**. n. 40: 797–803, 2000.

COELHO, M.B.; DESOUZA, I.A.; FREIRE, M.G.M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**. vol. 48. n. 5: 529-535, 2006.

CONAB. **Indicadores de agropecuária. Brasília, 2008.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 17 de maio 2008.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. Fortaleza, 20 maio, 2009. Disponível em:< www.consorcioantiferrugem.net/index.php?download=tabela_custos_ferrugem%202008.pdf>. Acesso em: 24 maio 2009.

COOLEY, M. B.; PATHIRANA, S.; WU, H. J.; KACHROO, P.; KLESSIG, D. F. Members of the *Arabidopsis* *HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. **Plant Cell**. n. 12: 663 – 676, 2000.

CRAIK, D. J. Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. **Toxicon**. n. 39:1809 –1813, 2001.

CRAIK, D. J. Circling the enemy: cyclic proteins in plant defence. **Cell Press**. Article in press, 2009.

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**. n. 39: 1464–1490, 1999.

DE SOUZA FILHO, G.A. ; FERREIRA, B.S.; DIAS, J.M.; QUEIROZ, K.S.; BRANCO, A.T.; BRESSAN-SMITH, R. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. **Plant Science**. n. **164**: 623–628, 2003.

DHAUBHADEL, S.; KUFLU, K., et al. A soybean seed protein with carboxylate-binding activity. **Journal of Experimental Botany**. n. 56: 2335 – 2344, 2005.

DÍEZ-DÍAZ, M.; CONEJERO, V.; RODRIGO, I.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. Isolation and characterization of wound-inducible carboxypeptidase inhibitor from tomato leaves. **Phytochemistry**. n. **65**: 1919–1924, 2004.

DO, H.M.; LEE , S.C.; JUNG, H.W.; SOHN , K.H.; HWANG. B.K. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. **Plant Science**. n. **166**: 1297–1305, 2004.

DONG, Q.; KROISS, L.; OAKLEY, F.D. Comparative EST analyses in plant systems. **Methods in Enzymology**. n. 395: 400–8, 2005.

DONOFRIO, N. M.; DELANEY, T. P. Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis nim 1–1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. **Molecular Plant–Microbe Interactions**. n. 14: 439 – 450, 2001.

EIDELS, L.; PROI, R.L.; HART, D.A. Membrane receptors for bacterial toxins. **Microbiological Reviews**. n. **47**: 596–620, 1983.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tecnologias para a produção de soja – Região Central do Brasil 2009. Londrina: EMBRAPA SOJA. 2009. 239p.

EWING, R.M.; KAHLA, A.B.; POIROT, O.; LOPEZ, F.; AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M. Large-scale statistical analysis of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. **Genetic Research**. n. 9: 950–959, 1999.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. n. 41:761 – 766, 2003.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stages on soybean development. Ames: Iowa State University/Cooperative Extension Service. **Special Report**. n. 80: 11, 1977.

FERREIRA-DA-SILVA, C.T.; GOMBAROVITS, M.E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C.M.; CARLINI, C.R. Proteolytic Activation of Canatoxin, a Plant Toxic Protein, by Insect Cathepsin-Like Enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. n. 44: 162-171, 2000.

FISCHER, B.; SUMNER, I.; GOODENOUGH, P. Isolation, Renaturation, and Formation of Disulfide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies. **Biotechnology and Bioengineering**. n. 41: 3-13, 1993.

FRAGOSO, R.R. Prospecção de moléculas-alvo para intervenção da interação planta-praga. 2006. 171 fls. **Tese (Doutorado em Biologia Molecular)** - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2006.

FRAGOSO, R.R.; BATISTA, J.A.; NETO, O.B.; GROSSI DE SA, M.F. Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Experimental Parasitology**. n. 110: 123–133, 2005.

FRANCO, O.L.; GONDIM, L.A.; BEZERRA, K.R.; GUERRA, M. E. C.; LIMA, C. R.F. M.; ENÉAS-FILHO, J.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E.. Partial purification and characterization of ribonucleases from roots, stem and leaves of *Cowpea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.13. n3:357-364, 2001.

FREIRE, M.G.M.; DE SOUZA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**. n. 42: 275–280, 2003.

FRONZA, V. Genética da reação da soja a *Fusarium solani* f. sp. glycines. **Tese (Doutorado em Agronomia)**. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, USP, Piracicaba -SP, 166 p. 2003.

GIJZEN, M.; KUFLU, K.; QUTOB, D.; CHERNYS J. T. A class I chitinase from soybean seed coat. **Journal of Experimental Botany**. n. 52: 2283 – 2289, 2001.

GIJZEN, M.; MILLER, S. S., et al. Localization of peroxidase mRNAs in soybean seeds by in situ hybridization. **Plant Molecular Biology**. n. 41: 57 – 63, 1999.

GOLDBERG, R. B.; HOSCHEK, G.; DITTA, G. S.; BREIDENBACH, R.W. Developmental regulation of cloned superabundant embryo mRNAs in soybean. **Developmental Biology** n. 83: 218-231, 1981.

GOLDBERG, R.B. 1991. DNA sequence organization in the soybean plant. **Biochemical Genetics**. n.16: 45–68, 1991.

GOLDBERG, R.B. DNA sequence organization in the soybean plant. **Biochemical Genetics**. n. 16: 45–68, 1978.

GOMBAROVITS, M.C. Peptídeos Entomotóxicos gerados a partir da CNTX: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. (**Dissertação de Mestrado**), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil; 1999.

GOMES-FILHO, E.; LIMA, C. R. F. M.; ENÉASFILHO, J.; GONDIM, L. A. AND PRISCO, J. T. Purification and properties of a ribonuclease from cowpea cotyledons. **Biologia Plantarum**. n. 42:525-532, 1999.

GRAHAM, M.Y.; WEIDNER, J.; WHEELER, K.; PELOW, M.J.; GRAHAM, T.L. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n. 63: 141–149, 2003.

GRAVINA, G. A.; MARTINS-FILHO, S.; SIGUEYUKI, C.; CRUZ, S. C. D. Parâmetros genéticos da resistência da soja a *Cercospora sojina*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, vol.39. n.7: 653-659, 2004.

GRANT, G. Antinutritional factors of soybean: a review. **Food Nutrition Science**, 13: 317 – 348, 1989.

GRUBER, C. W.; CEMAZAR, M.; CLARK, R. J.; HORIBE, T.; RENDA, R.F.; ANDERSON, M.A.; CRAIK, D. J. A novel plant protein disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. **Toxicon**. n. 49:561 - 575, 2007.

GURLEY, W.B.; HEPBURN, A.G.; KEY, J.L. Sequence organization of the soybean genome. **Biochimica and Biophysica Acta**. n. 561: 167–183, 1979.

HAJDUCH, M. 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**. n. 1, 2005.

HAMEL, F.; BOIVIN, R.; TREMBLAY, C.; BELLEMARE, G. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. **Journal of Molecular Evolution**. n. 44:614 - 624, 1997.

HARADA, J.J.; BARKER, S. J; GOLDBERG, R. Conglycinin Genes Are Clustered in Several DNA Regions and Are Regulated by Transcriptional and Posttranscriptional Processes. **The Plant Cell**. vol. 1 n. 4: 415-425, 1989.

HARTLEY, M.R.; LORD, J.M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from Plants. **Biochim. Biophys. Acta**. n. 1701: 1–14, 2004.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean rust Research: Progress and Future Prospects. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE. **Proceedings Chiang Mai: Kasetsart University Press**. p.180 - 186, 1997.

HEATH, M. Non-host resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**. n. 3: 315- 319, 2000.

HENRIKSEN, A.; MIRZA, O.; INDIANI, C.; TEILUM, K.; SMULEVICH, G.; WELINDER, K.G.; GAJHEDE, M. Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. **Protein Science**. n. 10: 108–115, 2001.

HERMAN, E.M.; HELM, R.M., JUNG, R.; KINNEY, A.J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. **Plant Physiology**. n. 132: 36–43, 2003.

HILL, J. E.; BREIDENBACH, R. W. Protein of soybean seeds. **Plant Physiology**. n. 53: 747 – 751, 1974.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St Paul, vol.57: 1025-1028, 1973.

IQBAL, M.J.; YAEGASHI, S.; AHSAN, R.; SHOPINSKI, K.L.; LIGHTFOOT, D.A. Root response to *Fusarium solani* f. sp. *glycines*: temporal accumulation of transcripts in partially resistant and susceptible soybean. **Theoretical and Applied Genetics**. vol. 110. n. 8: 1429, 2005.

JANSEN, D.H.; Ryan, C.A.; LIENER, I.E. Pearce G. Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. **Journal of Chemical Ecology**. n. 12: 1469–1480, 1986.

JENNINGS, C. V.; ROSENGREN, K. J.; DALY, N. L.; PLAN, M.; STEVENS, J.; SCANLON, M. J.; WAINE, C.; NORMAN, D.G.; ANDERSON, M.A.; CRAIK, D.J. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do Mobius strips exist in nature? **Biochemistry**. n. 44: 851 – 860, 2005.

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

JONES, D. A., TAKEMOTO, D. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Immunology**. n. 16: 48- 62, 2004.

JONGENEEL, C.V. Searching the expressed sequence tag (EST) databases: panning for genes. **Brief Bioinformatics**. n. 1: 76–92, 2000.

K.G. WELIDER, S.K. RASMUSSEN, C. PENEL and H. GREPPIN, Editors, *Plant Peroxidases*. **Biochemistry and Physiology**. University of Geneva, Switzerland: 35–42, 1992.

KALPANA, K., MARUTHASALAM, S., RAJESH, T. *et al.* Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins. **Plant Science**, 2005.

KIRUBAKARAN, S. I.; SAKTHIVEL, N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. n. 52: 159–166, 2007.

KOMATSU, S.; AHSAN, N. Soybean proteomics and its application to functional analysis. **Journal of Proteomics**. vol.72. n. 3: 325-336, 2009.

KOMATSU, S.; TOORCHI, M.; YUKAWA, K. Soybean proteomics. **Current Proteomics**. n. 4: 182–186, 2007.

KRAUSS, V.; REUTER, G. Two Genes Become One: The Genes Encoding Heterochromatin Protein SU(VAR)3-9 and Translation Initiation Factor Subunit eIF-2g Are Joined to a Dicistronic Unit in Holometabolic Insects. **Genetics**. n. 156: 1157–1167, 2000.

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

LEI, Z.; ELMER, A.M.; WATSON, B.S.; DIXON, R.A.; MENDES, P.J.; SUMNER, L.W. A two-dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of 1367 protein from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*. **Molecular Cell Proteomics**. n. 4: 1812–1825, 2005.

LEPPLA, N.C.; ASHLEY, T.R.; GUY, R.H.; BUTLER, G.D. Laboratory life history of the velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**. vol.70. n.2: 217-220, 1977.

LI, L.; LI, C.; LEE, G.I.; HOWE, G.A. Distinct roles for jasmonic acid synthesis and action in the systemic wound response of tomato. **Proceedings of National Academic of Sciences**. n. 9: 6416–6421, 2002.

LIENER, I.E. The intraperitoneal toxicity of concentrates of the soybean trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**. n. 193: 183–188, 1951.

LILLEY, C.J.; DEVLIN, P.; URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. **Parasitology Today**. n. **15**: 414–417, 1999a.

LILLEY, C.J.; URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J. Characterization of plant nematode genes: identifying targets for a transgenic defence. **Parasitology**. n. **118**: 63–72, 1999b.

LIMA, J.E.; SAMPAIO, A.L.F.; HENRIQUES, M.G.M.; BARJA-FIDALGO, C. Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) in vivo and in vitro. **Immunopharmacology**. n. **41**: 147–155, 1999.

LOCKHART, J.D.; WINZELER, A.E. Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature**. n. **405**: 827–835, 2000.

MARRA, B.M.; SOUZA, D.S.L.; AGUIAR, J.N.; FIRMINO, A. A.P.; SARTO, R.P.D.; SILVA, F.B.; ALMEIDA, C.D.S.; CARES, J.E.; CONTINHO, M.V.; MARTINS-DE-SA, C.; FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-SA, M.F. Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots. **Peptides**. vol.30. n. 5: 825-831, 2009.

MIDDELBERG, A.P.J. The Influence of protein refolding strategy on cost for competing reactions. **Chemical Engineering Journal**. n. **61**: 41–52, 1996.

MOISE, J.A.; HAN, S.; GUDYNAITE-SAVITCH, L.; JOHNSON, D.A.; MIKI, B.L.A. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. n. **41**: 620–644, 2005.

MOONEY, B.P.; 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**. n. **65**: 1733–1744, 2004.

MORAIS, J. K. S. Aspectos estruturais da toxina da soja (SBTX) e sua participação na defesa vegetal. 2007. 113f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2007.

MOREIRA, R.A.; BARROS, A.C.H.; STEWART, J.C.; PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**. n. **158**: 63–69, 1983.

NAGARAJ, S.H.; GASSER, R.B.; RANGANATHAN, S. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. **Briefings in bioinformatics**. vol. 8. n. 1: 6-21, 2006.

NAKAJIMA, H.; MURANAKA, T.; ISHIGE, F.; AKATSU, K.; OEDA, K.. Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. **Plant Cell Reports**. n. 16: 674 – 679, 1997.

NASI, A.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins - Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of Proteomics**. vol. 72. n.3: 527-538, 2009.

NATARAJAN, S.; XU, C. P., et al. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Analytical Biochemistry**. n. 342: 214 – 220, 2005.

NATARAJAN, S.; XU, C.; BAE, H.; CAPERNA, T.J.; GARRETT, W.M. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. n. 54: 3114–3120, 2006.

NATURE. The Arabidopsis Genome Initiative, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. n. 408: 796–815, 2000.

NATURE. International Rice Genome Sequencing Project, The map-based sequence of the rice genome. n. 436: 793–800, 2005.

NEUHAUS, J. M. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta, S. K. and Muthukrishnan, S. "**Pathogenesis-Related Proteins in Plants**", CRC Press. p. 77–105, 1999.

NG, T.B. **Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins**. **Peptides**. n. 25:1215 -1222, 2004.

NIELSEN, K.; BOSTON, R.S. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. n. 52: 785–816, 2001.

NIELSEN, N.C.; DICKINSON, C.D.; CHO, T.J. Characterization of the glycinin gene family in soybean. **Plant Cell**. vol. 3. n. 1: 313–328, 1989.

OH, B.J.; KO, M.K.; KOSTENYUK, I.; SHIN, B.; KIM, K.S. Coexpression of a defensin gene and a thionin-like gene via different signal transduction pathways in pepper and *Colletotrichum gloeosporioides* interactions. **Plant Mol Biol**. n. 41: 313–319, 1999.

OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n. 51: 333–345, 1997.

OLIVEIRA, J.T.A.; VASCONCELOS, I.M.; GONDIM, M.J.L.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, L.I.M. Canavalia brasiliensis seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **Journal of the Science Food and Agriculture**. n. 64, 417–424, 1994.

OLSNES, S.; PHIL, A. In: COHEN, P.; VAN HEYRINGEN, S. (Eds.). Toxic Lectins and Related Proteins in Molecular Action of Toxins and Viruses. Elsevier: 51–105, 1982.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomics. **Nature**. n. 405: 837–845, 2000.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O.L. Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **Journal of Biochemistry and Cell Biology**. n. 37: 2239 – 2253, 2005.

PERCY J. D.; PHILIP R.; VODKIN L. O. A defective seed coat pattern (Net) is correlated with the post-transcriptional abundance of soluble proline-rich cell wall proteins. **Plant Molecular Biology**. n. 40:603 – 613, 1999.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. n. 109, 347–352, 1995.

POWELL, A. L. T.; VAN KAN, J.; TENHAVE, A.; VISSER, J.; GREVE, L. C.; BENNETT, A. B.; LABAVITCH, J. M.. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. **Molecular Plant– Microbe Interaction**. n. 13: 942 – 950, 2000.

PUNJA, Z. K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. **Canadian Journal of Plant Pathology**. n. 23: 216 – 235, 2001.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against-knot nematodes. **Plant Science**. n.164: 517–523, 2003.

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

RUDD, S. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? **Trends in Plant Science**. n. 8: 321–329, 2003.

RYAN, C.A.; MOURA, D.S. Systemic wound signaling in plants: a new perception. **Proceedings of National Academic of Sciences**. n. 99: 6519–6520, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, L. F. L. Toxina da Salsa (*Ipomoea asarifolia* R. et. Schult.): Aspectos, Bioquímicos, Estruturais, Funcionais e Potencial Biotecnológico. **Tese (Doutorado em Bioquímica)**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ceará, 142 p., 2001.

SANTOS, P.O.; SANTOS, I.S.; GOMES, V.M.; MACHADO, O.L.T.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J.; OLIVEIRA, A.E.A. *In vitro* evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. **Journal of Stored Products Research**. vol. 44. n. 4: 310-315, 2008.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal of Immunology**. n. 153: 1798–1807, 1994.

SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**. n. 4: 2522–2532, 2004.

SCALLON, B.J.; THANH, V.H.; FLOENER, L.A. Identification and characterization of DNA clones encoding group-II glycinin subunits. **Theoretical Applied Genetics**. vol.5. n. 70: 510–519, 1985.

SCHICKLER, H.; CHET., I.. Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. n. 19:196-201, 1997.

SCHULER, M. A.; LADIN, B. F.; FRYER, G.; POLLACO, J. G.; BEACHY, R. N. Structural sequences are conserved in the genes coding for the *a'*, *a*, and *p* subunits of the soybean seed storage protein and other seed proteins. **Nucleic Acids Research**. n. 10, 8245-8260, 1982.

SEGURA, A; MORENO M., MOLINA A., GARCIA-OLMEDO, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). **FEBS Letters**. n. 435:159 -162, 1998.

SELS, J.; MATHYS, J.; CONINCK, B.M.A.; CAMMUE, B.P.A.; BOLLE, M.F.C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides **Plant Physiology and Biochemistry**. vol. 46. n.11: 941-950, 2008.

SENGUPTA, C.; DELUCA, V.; BAILEY, D. S.; VERMA, D. P. S. Posttranscriptional processing of 7s and 11 S components of soybean storage proteins. **Plant Molecular Biology** n. 1: 19-34, 1981.

SESSA, D. J.; WOLF, W. J. Bowman–Birk inhibitors in soybean seed coats. **Industrial Crops Production**. n. 14: 73 – 83, 2001.

SHOEMAKER, R.; KEIM, P.; VODKIN, L.; RETZEL, E.; CLIFTON, S. W.; WATERSTON, R.; SMOLLER, D.; CORYELL, V.; KHANNA, A.; ERPELDING, J.; GAI, X.; BRENDEL, V.; RAPH-SCHMIDT, C.; SHOOP, E.G.; VIELWEBER, C.J. ; SCHMATZ, M.; PAPE, D.; BOWERS, Y.; THEISING, B.; MARTIN, J.; DANTE, M.; WYLIE, T. ; GRANGER, C. A compilation of soybean ESTs: generation and analysis. **Genome**. n. 45: 329–338, 2002.

SIEBRA, E. A. SBTX, Uma Nova Toxina Protéica das Sementes de Soja [*Glycine max* (L.) merr.] cv. BR-10. Isolamento e Caracterização. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ce, 109 p. 1998.

SIEBRA, E. A. Toxina da Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: Aspectos Bioquímicos e seu Provável Papel na Defesa da Planta. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ce, 148 p. 2004.

SIEGEL, B. Plant peroxidases an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**. n. **12**: 303–312, 1993.

SILVA, C.A.; MONTEIRO, M.B.B.; BRAZOLIN, S.; LOPEZ, G.A.C.; RICHTER, A.; BRAGA, M.R. Biodeterioration of brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae) by rot fungi and termites. **International Biodeterioration & Biodegradation**. n. **60**: 285–292, 2007.

SINGH, R. J.; HYMOWITZ, T.; The genomic relationship between *Glycine max* (L.) Merr. and *G. Soja* Sieb. and Zucc. as revealed by pathytene chromosome analysis. **Theoretical and Applied Genetics**. n. **76**: 705–711, 1988.

SOMSSICH, I.E.; SCHMELZER, E.; BOLLMANN, J.; HAHLBROCK, K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academic Sciences**. n. **83**: 2427–2430, 1986.

SOUSA, D. O. B. Soyatoxina-2, uma nova toxina de sementes de soja: aspectos estruturais, do mecanismo de ação e efeitos biológicos. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ce, 158 p. 2006.

SPEED, M.A.; WANG, D.I.C.; KING, J. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. **Nature Biotechnology**. n. **14**: 1283–1287, 1996.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical Biochemistry**. n. **209**: 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**. n. **45**: 753–760, 2005.

STUIVER, M. H.; CUSTERS, J.H. H. V. Engineering disease resistance in plants. **Nature**. vol. 411. n. 14: 865-868, 2001.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ISHIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of pineapple (*Ananas comosus*) leaf chitinases. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**. n. 69:189 – 196, 2005.

TAM, J. P.; LU, Y. A.; YANG, J. L.; CHIU, K. W. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. **Proceeding of National Academy of Sciences**. n. 96: 8913 – 8918, 1999.

TERRAS, F.R.G.; SCHOofs, H.M.E.; DE BOLLE, M.F.C.; VAN LEUVEN, F.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **Journal of Biochemical Chemistry**. vol. 22. n. 267: 15301–15309, 1992.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: Subunit structure of pconglycinin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. n. 26: 692-695, 1978.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Heterogeneity of 0- conglycinin. **Biochimica and Biophysica Acta**. n. 439: 326-338, 1976.

THELEN, J.; OHLROGGE, J. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. **Metabolic Engineering**. n. 4: 12–21, 2002.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n. 76: 4350–4354, 1979.

TOYODA, K. *et al.* Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. **Transgenic Research**. n.11: 567 - 582, 2002.

TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. n. 12: 53–77, 2001.

TSUGITA, A.; KAMO, M. 2-D electrophoresis of plant proteins. **Methods in Molecular Biology**. n.112: 95–97, 1999.

TUMER, N.E.; THANH, V.H.; NIELSEN, N.C. Purification and characterization of mRNA from soybean seeds. **Journal of Biological Chemistry**. vol. 16. n. 256: 8756–8760, 1981.

TUMER, N.E.; RICHITER, J.D.; NIELSEN, N.C. Structural characterization of the glycinin precursors. **Journal of Biological Chemistry**. vol. 8. n. 257: 4016–4018, 1982.

TURRÀ, D.; BELLIN, D.; LORITO, M.; GEBHARDT, C.. Genotype-dependent expression of specific members of potato protease inhibitor gene families in different tissues and in response to wounding and nematode infection. **Journal of Plant Physiology**. vol. 166. n. 7: 762-774, 2009.

UDVARDI, M.K.; TABATA, S.; PARNISKE, M.; STOUGAARD, J. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. **Trends Plant Sci**. n. 10: 222–228, 2005.

United States Agriculture Department (USDA). **Brazilian Export Soybean Transport Indicator Reports**. Disponível em: <http://www.ams.usda.gov>. Acesso em: 20 maio 2009.

URWIN, P.E.; MCPHERSON, M.J; ATKINSON, H.J. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. **Planta**. n. 204: 472–479, 1998.

van LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Reviews of Phytopathology**. n. 44:135–62, 2006.

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**. n. 312: 357-366, 1994.

VASCONCELOS, I.M.; SIEBRA, E.A.; MAIA, A.A.B.; MOREIRA, R.A.; NETO, A.F.; CAMPELO, G.J.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science Food Agriculture**. n. 75: 419–426, 1997.

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. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. n. 12: 1–8, 2001.

VASCONCELOS, I.M.; MORAIS, J.K.S.; SIEBRA, E.A.; CARLINI, C.R.; SOUSA, D.O.B.; BELTRAMINI, L.M.; MELO, V.M.M.; OLIVEIRA, J.T.A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**. vol. 51 n. 6: 952-963, 2008.

WANG, C.; WU, X.; JIA F.; ZHANG, J.; CHEN, S. Genetic variations of glycinin subunit genes among cultivated and wild type soybean species. **Progress in Natural Science**. vol.18. n. 1: 33-41, 2008.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**. n. 27: 2782–2786, 2006.

WANG, X.; LI, X.; LI, Y. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. **Biotechnology Letters**. vol. 29. n. 10: 1599-603, 2007.

WELIDER, K.G.; RASMUSSEN, S.K.; PENEL, C.; GREPPIN, H. **Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology**, University of Geneva, Switzerland 35–42, 1992.

WENG, W.M.; GAO, X.S.; ZHUANG, N.L. The glycinin A3B4 mRNA from wild soybean *Glycine soja* Sieb. et ZUCC. **Plant Physiology**. vol.2. n. 17: 665–666, 1995.

XING, A.; ZHANG, Z.; SATO, S.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans. **In Vitro Cell Development Biology**. n. 36: 456–463, 2000.

YEBOAH, N. A.; ARAHIRA M., et al. A class III acidic endochitinase is specifically expressed in the developing seeds of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) **Plant Molecular Biology**. n. 36: 407 – 415, 1998.

YORINORI, J. T. Ferrugem da Soja: panorama geral. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3. Foz do Iguaçu, 2004. **Proceedings**. Londrina: Embrapa Soybean, 2004.

YORINORI, J. T. Potential for integrated disease management in soybean. **Proceedings World Soybean Research**. n. 9:4350 - 4, 1997a.

YORINORI, J. T. Reação das cultivares brasileiras de soja à nova raça Cs-23 de *Cercospora sojina*. **Fitopatologia Brasileira**. n. 22: 321 – 328, 1997b.

YORINORI, J.T.; KLINGELFUSS, L.H. Novas raças de *Cercospora sojina* em soja. **Fitopatologia Brasileira**. vol.24: 509-512, 2000.

ZHANG, Z.A.; XING, P.; STASWICK, T.; CLEMENTE, T. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. n. 56: 37–46, 1999.

ZHU, Q.; MAHER, E. A.; MASOUD, S.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. **Biotechnology**. n. 12: 807 – 812, 1994.