



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

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

***Mo*-CBP₃ - UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lamarck COM POTENCIAL USO NO CONTROLE DE FUNGOS E NEMATOIDES FITOPATOGÊNICOS**

**FORTALEZA
2014**

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

Mo-CBP₃ - UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lamarck COM POTENCIAL USO NO CONTROLE DE FUNGOS E NEMATÓIDES FITOPATOGÊNICOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A449m Almeida, Marina Gabrielle Guimarães de.
Mo-CBP₃ – Uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck com potencial uso no controle de fungos e nematoides fitopatogênicos / Marina Gabrielle Guimarães de Almeida. -2014.
67 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.
1. Proteína vegetal. 2. Atividade antifúngica. 3. Atividade nematocida. 4. Controle de doenças.
I. Título.

CDD 660.6

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

Mo-CBP₃ - UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lamarck COM POTENCIAL USO NO CONTROLE DE FUNGOS E NEMATÓIDES FITOPATOGÊNICOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Daniele Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A **Deus**.

Aos meus pais, **Marcos e Angelina**.

Ao meu noivo, **Eduardo**.

Às minhas irmãs, **Aline e Lívia**.

À família **LabTox**.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por ter me concedido a vida e mostrar os caminhos certos.

Aos meus pais, *Marcos* e *Angelina*, por serem o meu porto seguro, por sempre estarem ao meu lado e por primarem pela minha educação.

Aos meus avós, *Severo* e *Inocência*, por estarem presentes em todos os momentos de minha vida.

Às minhas irmãs, *Aline* e *Lívia*, pelo bom exemplo, por todo apoio e amor.

Ao meu cunhado *Felipe*, e à minha futura cunhada *Naynara*, pelo carinho.

Ao meu noivo *Eduardo*, pelo apoio dado ao meu crescimento acadêmico e científico, pelo seu otimismo e por todo amor e atenção.

À Dra. *Ilka Maria Vasconcelos*, agradeço imensamente pelos quatro anos de orientação, por ter contribuído para a minha formação científica, pelos ensinamentos, pela confiança depositada em mim e dedicação.

Ao Dr. *José Tadeu de Abreu Oliveira*, pelas sugestões e dicas para o desenvolvimento deste trabalho e disponibilidade do seu laboratório.

À Dra. *Mirella Leite Pereira*, pelos ensinamentos, pelas boas dicas científicas e ajuda no desenvolvimento da minha monografia.

À Dra. *Daniele Oliveira Bezerra de Sousa* e ao Dr. *Hermógenes David de Oliveira*, pelo apoio, sugestões e amizade.

Ao Dr. *Francisco das Chagas Freire*, por tão prontamente ter aceitado auxiliarme em parte dos experimentos realizados.

À Dra. *Carmem Dolores Gonzaga Santos* e a sua estudante de mestrado *Lainara*, pela colaboração prestada em parte dos experimentos.

Aos meus amigos de curso, *Camila Tauane*, *Acrísio Bastos* e *Roberta Laiz*, pelos momentos de descontração e laço forte de amizade que se criou.

Aos amigos do laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, *Handerson*, *Rodolpho*, *Thiago*, *Ana Lídia*, *Ana Luísa*, *Fredy* e *Pedro*, pela ajuda nos experimentos e por todo apoio.

À Família LabTox, *Mariana*, *Bella*, *Ana Paula*, *João Xavier*, *Paulo Carvalho*, *Tiago Deiveson*, *Clídia*, *Tarcymara*, *Isabelle*, *Nadine*, *Raquel Rocha*, *Juliana Gifoni* e *Henrique*, pelo companheirismo, por compartilhar as bancadas e pelo apoio diário.

Em especial, agradeço:

À *Adelina Braga*, que foi minha “chefinha” científica por alguns anos, pelos ensinamentos e por ter se tornado uma grande amiga.

À *Helen Costa*, pela sabedoria invejável transmitida na bancada.

À *Janne Keila*, pelo apoio, atenção e amizade.

Ao meu amigo *Lucas Pinheiro*, que se tornou uma pessoa especial na minha vida, agradeço o apoio constante durante a realização dos meus experimentos e no desenvolvimento da minha monografia.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará - Laboratório de Toxinas Vegetais (LabTox), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - através da concessão de bolsa de Iniciação Científica à autora do trabalho e, também, auxílio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

Demais Instituições de Fomento e Apoio à Pesquisa – CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

RESUMO

Moringa oleifera Lamarck é uma planta pertencente à família Moringaceae, nativa do Noroeste da Índia, que tem se desenvolvido bem em vários países dos trópicos, inclusive no Brasil, particularmente na região Nordeste. Por nosso grupo de pesquisa, foi purificada uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, denominada *Mo-CBP₃*, apresentando potente atividade contra fungos fitopatogênicos. Este trabalho teve como objetivos avançar na caracterização da atividade antifúngica de *Mo-CBP₃* e, adicionalmente, avaliar seu potencial nematicida sobre o nematoide das galhas. Para tanto, após a obtenção e o acúmulo da proteína, seu espectro de ação antifúngica foi avaliado, utilizando diferentes fungos fitopatogênicos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*) de relevância agrícola. *Mo-CBP₃* inibiu a germinação de todos eles, nas concentrações de 0,05 ou 0,1 mg/mL, caracterizando uma atividade antifúngica de amplo espectro, portanto, não espécie-específica. Quando avaliada a estabilidade da atividade antifúngica às variações de temperatura e pH, usando como modelo *F. solani*, *Mo-CBP₃* (0,1 mg/mL), mesmo após tratamento térmico (100 °C, 60 minutos) ou solubilização em diferentes pHs (de 4,0 a 12,0), manteve sua ação inibitória sobre a germinação dos conídios, mostrando-se funcionalmente estável nestas condições. Por outro lado, o tratamento da proteína com agente redutor (DTT 0,01 M, 30 minutos) aboliu a atividade antifúngica de *Mo-CBP₃*. Essa proteína, nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL, também se mostrou capaz de interferir na fase de crescimento micelial do fungo *F. solani*, apresentando taxas de inibição de 62%, 66%, 88% e 95%, respectivamente. O modo de ação antifúngica de *Mo-CBP₃* depende da concentração proteica usada, podendo ser fungistático (0,5 mg/mL) ou fungicida (1,0 mg/mL). *Mo-CBP₃* (0,1 - 0,5 mg/mL) também apresentou atividade nematicida, causando uma redução de 76% na eclosão de ovos do nematoide das galhas *Meloidogyne* spp., após 48 horas de incubação com a proteína. Variação da atividade nematicida foi observada com o tempo, mas não entre as diferentes concentrações de *Mo-CBP₃* testadas. Os dados, em conjunto, reforçam que *Mo-CBP₃* participa dos mecanismos de defesa vegetal e demonstram seu potencial biotecnológico para uso no controle de doenças causadas por fungos e nematoides em plantas.

Palavras-chave: Proteína vegetal; moringa; atividade antifúngica; atividade nematicida; potencial biotecnológico; controle de doenças.

ABSTRACT

Moringa oleifera Lamarck belongs to Moringaceae family, it is native from Northwestern India and well adapted throughout the tropics, including Brazil, particularly in the Northeast. Recently, our research group isolated a chitin-binding protein named *Mo*-CBP₃ from *M. oleifera* seeds, presenting potent antifungal activity against phytopathogenic fungi. This current work aimed to gain new insights into the antifungal activity of *Mo*-CBP₃ and, in addition, to assess its nematicidal potential on root-knot nematodes. For this, *Mo*-CBP₃ was firstly purified and accumulated and, subsequently, its spectrum of antifungal action evaluated against different phytopathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae*) of agricultural relevance. *Mo*-CBP₃ inhibited the spore germination of all fungi tested at 0.05 or 0.1 mg/mL, demonstrating that its antifungal activity is not specie-specific. *Mo*-CBP₃ retains its antifungal activity against *F. solani* regardless of temperature (100 °C, 60 minutes) and pH (from 4,0 to 12,0), remaining functionally stable under these conditions. On the other hand, the treatment of *Mo*-CBP₃ with a reducing agent (0.01 M DTT, 30 minutes) abolished its antifungal activity. This protein, at 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/mL, also delayed the mycelia growth of *F. solani*, causing 62%, 66%, 88% and 95% inhibition, respectively. *Mo*-CBP₃ has both fungistatic (0.5 mg/mL) and fungicidal (1.0 mg/mL) effects, depending on the concentration used. The evaluation of nematicidal activity against *Meloidogyne* spp. eggs revealed that *Mo*-CBP₃ (0.1, 0.2 and 0.5 mg/mL) was able to inhibit the number of hatched J2 (second-stage juvenis) by 76%, after 48 hours of egg incubation with the protein. Changes in the nematicidal activity were observed with time, but no between *Mo*-CBP₃ concentrations tested. Altogether, these results reinforce that *Mo*-CBP₃ might be involved in plant defense mechanisms and it could be used as a potential agent for controlling fungal pathogens and parasitic nematodes in plants.

Keywords: Plant protein; moringa; antifungal activity; nematicidal activity; biotechnological potential; disease control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Ciclo de vida dos fungos.....	16
Figura 2 - Ciclo de vida do nematoide formador de galhas <i>Meloidogyne</i> spp.....	20
Figura 3 - Protocolo de obtenção de <i>Mo</i> -CBP ₃	29
Figura 4 - Perfil cromatográfico das albuminas de sementes de <i>M. oleifera</i> em matriz de quitina.....	37
Figura 5 - Perfil cromatográfico das proteínas ligantes à quitina (P _{NAG}) em matriz de Resource S.....	38
Figura 6 - Perfil eletroforético de <i>Mo</i> -CBP ₃ em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença e ausência do agente redutor β-mercaptoetanol.....	40
Figura 7 - Inibição da germinação de conídios de diferentes fungos fitopatogênicos causada por <i>Mo</i> -CBP ₃	42
Figura 8 - Efeito da temperatura sobre a atividade antifúngica de <i>Mo</i> -CBP ₃	43
Figura 9 - Efeito do pH sobre a atividade antifúngica de <i>Mo</i> -CBP ₃	44
Figura 10 - Efeito do agente redutor DTT sobre a atividade antifúngica de <i>Mo</i> -CBP ₃	45
Figura 11 - Curvas de crescimento do fungo <i>F. solani</i> na presença de <i>Mo</i> -CBP ₃ em diferentes concentrações.....	46
Figura 12 - Viabilidade de conídios de <i>F. solani</i> após incubação com <i>Mo</i> -CBP ₃ em diferentes concentrações.....	48
Figura 13 - Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₃ sobre a eclosão de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp.....	49

LISTA DE TABELA

	Página
Tabela 1 - Conteúdo e rendimento de proteína das amostras resultantes em cada etapa do processo de purificação de <i>Mo</i> -CBP ₃	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Meio de cultura Ágar-Batata-Dextrose
BSA	Bovine serum albumin
DTT	Ditiotreitol
F 0-90%	Fração albumina concentrada com sulfato de amônio a 90% de saturação
FPLC	Cromatografia Líquida Rápida de Proteína (do inglês, <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
Mo-CBP	Proteína ligante à quitina de <i>M. oleifera</i>
Mo-CBP ₃	Terceira proteína ligante à quitina de <i>M. oleifera</i> obtida da matriz de Resource S com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,05 M
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
P _{AC}	Pico eluído da matriz de quitina com solução de ácido acético 0,05 M
P _{NAG}	Pico eluído da matriz de quitina com solução de <i>N</i> -acetil-D-glucosamina 0,1 M
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Fungos fitopatogênicos e danos à agricultura.....	14
1.2 Fitonematóides e danos à agricultura.....	18
1.3 Proteínas ligantes à quitina.....	21
1.4 <i>Moringa oleífera</i>	23
1.5 Proposta do trabalho.....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos.....	26
3 MATERIAIS.....	27
3.1 Sementes de <i>Moringa oleífera</i>	27
3.2 Fungos filamentosos.....	27
3.3 Reagentes e outros materiais.....	27
4 MÉTODOS.....	28
4.1 Processamento das sementes de <i>M. oleífera</i>	28
4.2 Obtenção da proteína ligante à quitina <i>Mo</i> -CBP ₃	28
4.3 Dosagem de proteínas.....	30
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	30
4.5 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> de <i>Mo</i> -CBP ₃ frente a fungos fitopatogênicos	31
4.5.1 <i>Manutenção das culturas dos fungos filamentosos</i>	31
4.5.2 <i>Extração de esporos dos fungos filamentosos</i>	31
4.5.3 <i>Ensaio de inibição da germinação de conídios de fungos fitopatogênicos</i>	31
4.5.4 <i>Estabilidade da atividade inibitória da germinação de conídios de F. solani frente a agentes desnaturantes físicos e químicos</i>	32
4.5.4.1 <i>Estabilidade frente a temperaturas elevadas</i>	32
4.5.4.2 <i>Estabilidade frente a diferentes valores de pH</i>	32
4.5.4.3 <i>Estabilidade frente ao agente redutor ditiotreitól</i>	33
4.5.5 <i>Ensaio de inibição do crescimento micelial de F. solani</i>	33

4.5.6 Estudo do modo de ação de <i>Mo</i> -CBP ₃	34
4.6. Avaliação da atividade nematicida <i>in vitro</i> de <i>Mo</i> -CBP ₃ frente ao <i>Meloidogyne ssp</i>	34
4.6.1 Obtenção dos ovos	34
4.6.2 Avaliação do efeito de <i>Mo</i> -CBP ₃ na eclosão de ovos.....	35
4.7 Análise estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Obtenção de <i>Mo</i> -CBP ₃	36
5.2 Atividade antifúngica de <i>Mo</i> -CBP ₃	41
5.2.1 Inibição da germinação de conídios de diferentes fungos fitopatogênicos causada pela <i>Mo</i> -CBP ₃	41
5.2.2. Estabilidade funcional de <i>Mo</i> -CBP ₃	41
5.2.3 Inibição do crescimento de <i>F. solani</i> causada por <i>Mo</i> -CBP ₃	41
5.2.4 Modo de ação antifúngica de <i>Mo</i> -CBP ₃	47
5.3. Atividade nematicida <i>in vitro</i> de <i>Mo</i> -CBP ₃ frente ao <i>Meloidogyne spp.</i> ..	47
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO.....	57
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos fitopatogênicos e danos à agricultura

Os fungos são micro-organismos eucariotos, aclorofilados e imóveis, que digerem os alimentos externamente e absorvem os nutrientes diretamente através de suas paredes celulares. Além disso, são organismos heterotróficos, obtendo o carbono e energia de outros organismos. Alguns obtêm seus nutrientes de um hospedeiro vivo, chamados de biotrófitos, outros retiram seus nutrientes a partir de plantas ou animais mortos, os saprófitos, outros, ainda, infectam hospedeiros vivos, matando as células hospedeiras, obtendo os nutrientes necessários, os chamados necrotróficos (ADAMS, 2004; CROUS *et al.*, 2009; CARRIS, LITTLE, STILES, 2012).

Não se sabe ao certo quantas espécies de fungos existem no nosso planeta neste momento, porém há uma estimativa de que existam 3,5 a 5,1 milhões (O'BRIEN *et al.*, 2005). No entanto, só foram descritas cerca de 100.000 espécies de fungos, e novas espécies são descritas a uma taxa de cerca de 1.200 por ano (KIRK *et al.*, 2008; BLACKWELL, 2011). Jahn e Jahn (1949) e Whittaker (1969) foram os primeiros a propor a classificação dos fungos em um reino à parte, esses organismos podem ser de vida livre, saprófitos, simbioses ou parasitas. Existem quatro filos principais de fungos: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e Zygomycota (WEBSTER; WEBER, 2007).

Uma das principais características de fungos que tem contribuído para o seu sucesso na exploração de diversos nichos ecológicos é a formação de um talo filamentoso chamado de micélio. O micélio é composto de ramificação de células tubulares microscópicas, chamadas de hifas, que crescem a partir de substratos ou fontes alimentares, secretando enzimas que quebram substratos complexos em compostos simples, os quais podem ser absorvidos pela parede celular (KIRK *et al.*, 2008).

A parede celular é uma estrutura essencial para o crescimento, sobrevivência e morfogênese dos fungos, sendo fundamental na sua habilidade de invadir o hospedeiro e resistir contra o mecanismo de defesa destes (LATGE'; BEAUVAIS, 2014). Normalmente, a parede celular é composta por polímeros lineares de β -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina, chamada de quitina, ou celulose (oomicetos), glucanos, lipídios, peptídeos e uma matriz proteica, variando a proporção e disposição desses elementos entre as espécies ou mesmo entre as fases do ciclo de vida da mesma espécie (CANTU *et al.*, 2009; AIRES *et al.*, 2012).

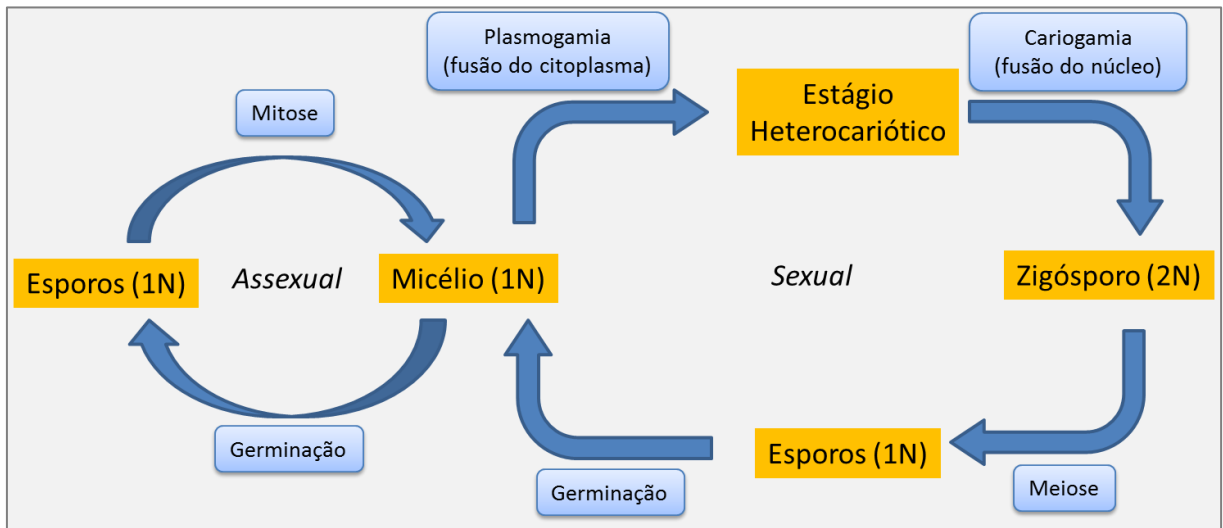
O ciclo biológico dos fungos pode variar de acordo com o filo, ocorrendo reprodução sexuada e assexuada, com produção de esporos assexuados, conídios e hifas. Porém, a grande maioria passa por etapas bastante similares (FIGURA 1). Em geral, esporos haploides (1N), estruturas reprodutivas, germinam e produzem hifas denominadas esporófitos, também haploides. As hifas se ramificam em todas as direções do substrato, de onde retiram os nutrientes de que necessitam, formando o micélio. Zigósporos diploides, ambientalmente resistentes, são produzidos a partir de dois haploides, passando pela fase de plasmogamia e cariogamia. Em seguida, sofrem meiose, produzindo esporos haploides, que podem se dispersar, germinar e produzir hifas no substrato, o micélio (CARRIS; LITTLE; STILES, 2012).

A associação entre fungos e plantas é conhecida há bastante tempo. Todavia, nem sempre esta associação traz benefício mútuo. Assim, os fungos representam um importante grupo de fitopatógenos. Existem milhares de espécies de fungos que, coletivamente, são responsáveis por 70% de todas as doenças conhecidas de plantas (AGRIOS, 2005). Estes patógenos são uma ameaça real para a agricultura mundial. Perdas significativas de rendimento ocorrem na maioria das espécies agrícolas e hortícolas devido ao ataque de fungos. Culturas de todos os tipos, muitas vezes, sofrem perdas irreparáveis. É o caso do arroz (LEE *et al.*, 2007), trigo (HUANG; GILL, 2001), cevada (SMITH, 2002), algodão (CUI *et al.*, 2000), amendoim (MACE *et al.*, 2006) e videira (DHEKNEY *et al.*, 2007), onde as doenças fúngicas correspondem à primeira ou segunda causa mais importante de diminuição do rendimento.

No Brasil, do ponto de vista econômico, o milho, o café e a soja são os principais produtos agrícolas afetados por essas doenças. Para a soja, foram identificadas dezenas de doenças causadas por fungos, 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, 2014).

Dentre os fungos fitopatogênicos, destacam-se aqueles do gênero *Fusarium*, correspondendo à causa principal de doenças importantes, tais como apodrecimento do caule de ervilha, podridão vermelha da raiz e síndrome da morte súbita da soja, podridão do pé de feijão e podridão seca de batata. Trata-se de um gênero composto por 32 espécies e 18 variedades (LUGINBUHL, 2010; INDEX FUNGORUM, 2011). *Fusarium solani* é uma espécie encontrada em vários tipos de solos, de florestas tropicais, sendo observados em campos úmidos e áreas temperadas. Este fungo é considerado um fitopatógeno que atinge um

Figura 1 – Ciclo de vida dos fungos



Fonte: autor.

número diversificado de plantas hospedeiras, como as leguminosas e outras plantas tropicais (LESLIE; SUMMERELL, 2006). *F. oxysporum* é outra espécie do gênero *Fusarium*, com uma ampla gama de hospedeiros, provocando graves prejuízos a diversas culturas como tomate, algodão e banana. Este fungo alcançou o quinto lugar, dos 10 fungos fitopatogênicos científica e economicamente mais importantes citados pela revista *Molecular Plant Pathology* (DEAN *et al.*, 2012). *Fusarium oxysporum* é um agente que se desenvolve ubiquamente no solo e provoca murchidão vascular em uma vasta gama de plantas. Sintomas característicos da doença incluem escurecimento vascular, epinastia da folha, nanismo, murcha progressiva, desfolhamento e morte da planta (AGRIOS, 2005).

Outro gênero comumente encontrado como causa de importantes perdas agrícolas é o *Colletotrichum*. Praticamente, todas as culturas cultivadas no mundo são suscetíveis a uma ou mais espécies deste gênero. Estes fungos causam manchas de antracnose e ferrugem na parte aérea, além de podridões pós-colheita (DEAN *et al.*, 2012).

O fungo basidiomiceto *Rhizoctonia solani*, transmitido através do solo, causa a rizoctoniose em muitas espécies vegetais de importância econômica em todo o mundo (GONZALEZ *et al.*, 2011). Este fungo causa queima da folha e/ou mela em soja e está também associado com outros hospedeiros, tais como arroz, milho, sorgo, feijão-de-corda e caupi (BASSETO *et al.*, 2007).

Para o controle dessas doenças fúngicas, geralmente, são usados agentes químicos, que, em sua maioria, são pouco específicos, eliminando organismos benéficos e causando riscos indesejados à saúde e ao meio ambiente (MANCZINGER; ANTAL; KREDICS, 2002). Um método promissor para a proteção de plantas contra fungos é produzir cultivares resistentes ao patógeno. Porém, estas cultivares podem se tornar obsoletas em um curto espaço de tempo, devido à rápida evolução dos fungos fitopatogênicos e surgimento de formas virulentas capazes de superar a resistência das plantas.

Nos últimos anos, o uso da biotecnologia vem ganhando destaque devido às técnicas de isolamento de genes e transformação genética, visando o desenvolvimento de transgênicos resistentes às doenças causadas por fungos. Avanços na tecnologia de transformação genética têm permitido a modificação de muitas culturas alimentares importantes, como arroz, trigo, milho, mostarda, legumes e frutas (WANI, 2010). Geralmente, a modificação genética destas plantas consiste em: (a) aumentar ou diminuir a expressão de vários genes que estão naturalmente presente num organismo, ou (b) transferir genes entre indivíduos da mesma espécie ou espécies diferentes. Para os dois tipos de modificação genética podem ser utilizados genes que codificam proteínas relacionadas a patogêneses (PR-Proteínas). Van Loon e van

Strein (1999) demonstraram, pela primeira vez, um conjunto de proteínas que são induzidas em plantas de tabaco após a infecção pelo vírus do mosaico do tabaco. Plantas hospedeiras contribuem com um enorme número de genes de resistência a doenças, tais como aqueles que codificam PR-Proteínas, podendo ser utilizados no combate às doenças fúngicas. As PR-Proteínas estão classificadas em 17 grupos, variando de PR-1 até PR-17, de acordo com as características de cada proteína, conforme descrito por Christensen e colaboradores (2002). Dentre as muitas proteínas supostamente envolvidas na proteção das plantas, encontram as proteínas ligantes à quitina, as quais merecem um destaque especial, pois a quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose e é um componente importante da parede celular da maioria dos fungos (AUNPAD; PANBANGRED, 2003).

1.2 Fitonematoides e danos à agricultura

Os fitonematoides são divididos em três gêneros, *Globodera*, *Heterodera* e *Meloidogyne*. Dentro dos dois primeiros gêneros, estão englobados os indivíduos formadores de cistos e, no último, aqueles que formam galhas. Os nematoides das galhas são endoparasitas sedentários mundialmente distribuídos que atacam mais de 2.000 espécies diferentes de plantas, causando perdas elevadas, principalmente na agricultura, silvicultura e no cultivo de plantas ornamentais (HASHEM; ABO-ELYOUSR, 2011; SIDDIQUI; ALI; NAIDU, 2014).

Estima-se que o ataque de nematoides às culturas de interesse econômico gera perda em torno de 12,5% na produção mundial de alimentos, o que representa um prejuízo anual de aproximadamente 157 bilhões de dólares. Nos Estados Unidos, estima-se que as perdas anuais ocasionadas por fitonematoides estão em torno de 10 bilhões de dólares, superando os prejuízos ocasionados pelo ataque de insetos (HASSAN *et al.*, 2013). Quatro espécies de *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*) são responsáveis por aproximadamente 90% das perdas econômicas causadas por nematoides das galhas em regiões tropicais e subtropicais (ECHEVERRIGARAY; ZACARIA; BELTRÃO, 2010). No Brasil, a principal cultura atacada é a soja, e os prejuízos anuais são estimados em cerca de 120 milhões de dólares (LI *et al.*, 2011). *M. javanica* e *M. incognita* são as principais espécies que atacam a cana-de-açúcar, sendo responsáveis por perdas em torno de 40% da produção brasileira (HASSAN *et al.*, 2013).

Os nematoides iniciam seu ciclo de vida na fase de ovo (FIGURA 2) e, logo em seguida, são formados os juvenis de primeiro estágio (J1). O estágio J1 permanece dentro do ovo, onde sofre ecdise e se transforma em juvenil de segundo estágio (J2), que é móvel e pode iniciar infecções. Esses indivíduos atacam as pontas das raízes em crescimento, invadindo as células da coifa. Após a invasão, os J2 dirigem-se para a área de alongamento celular, onde se alimentam de células especiais, denominadas de células nutridoras (células gigantes multinucleadas). As células adjacentes às células gigantes sofrem alterações morfológicas e fisiológicas drásticas, levando à hiperplasia e hipertrofia das mesmas, dando origem às galhas, principal sintoma causado por nematoides desse gênero em plantas (SILVA, 2012).

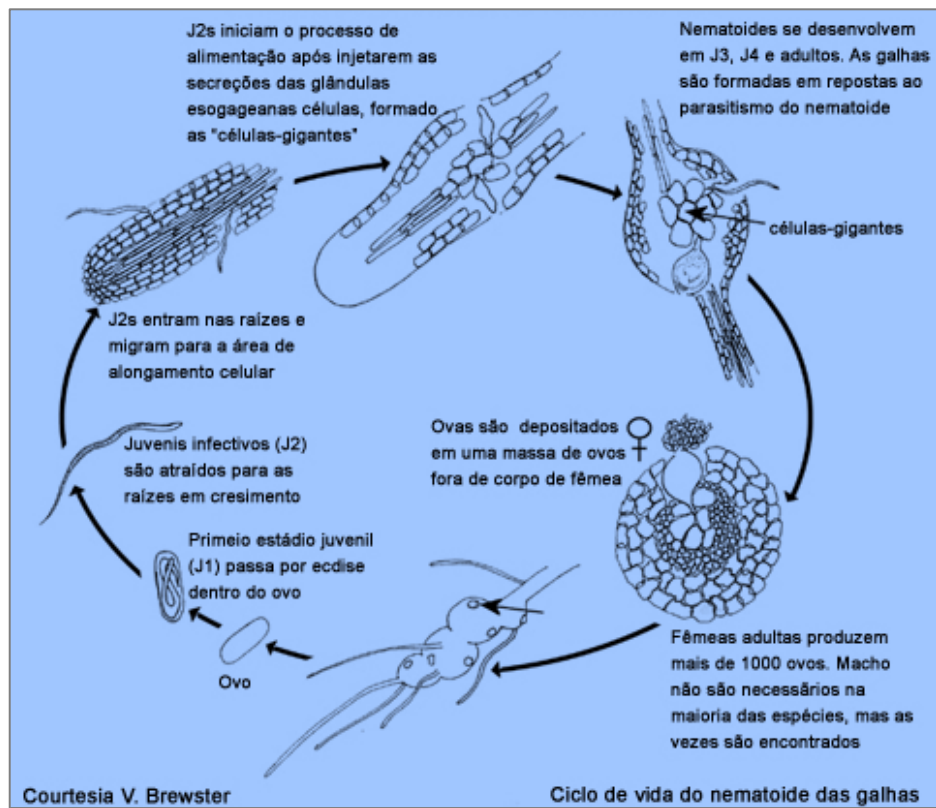
As larvas sofrem sucessivas mudanças e dão origem aos juvenis de terceiro e quarto estágios (J3 e J4, respectivamente). Este último sofre a última ecdise, originando a forma adulta, macho ou fêmea. A duração do ciclo de vida pode variar em função de fatores, como a temperatura, as condições do solo e a susceptibilidade da planta hospedeira. As fêmeas produzem ovos durante 3 meses, depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (FERRAZ *et al.*, 2010).

O controle dos nematoides das galhas é dificultado em função de sua capacidade reprodutiva alta, faixa ampla de hospedeiros e capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais. A partir do momento em que a área é infestada, a erradicação torna-se praticamente impossível e as medidas de controle que serão adotadas visarão apenas à redução da população de nematoides no solo (FERRAZ; DIAS; FREITAS, 2001).

A principal e mais empregada estratégia de controle dos nematoides é a aplicação de nematicidas (organofosforados e carbamatos), compostos químicos que afetam a acetilcolinesterase, impedindo a transmissão de estímulos nervosos. Dessa forma, os nematoides afetados permanecem imóveis e não se alimentam enquanto dura o efeito do nematicida (cerca de dois a três meses) e acabam morrendo por inanição (ARAÚJO, 2009). Entretanto, o uso de nematicidas químicos tem se mostrado caro e pouco eficiente. A aplicação prolongada e indiscriminada desses compostos tem ocasionado uma série de efeitos negativos, tais como intoxicação do homem e animais, contaminação de fontes de água, destruição da microflora do solo e, ao longo prazo, seleção de biótipos de nematoides resistentes (NUNES; MONTEIRO; POMELA, 2010; CORBANI *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2013).

Diversas medidas alternativas de controle têm sido propostas em substituição ao uso dos nematicidas químicos. O fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* tem sido um dos

Figura 2 – Ciclo de vida do nematoide formador de galhas *Meloidogyne* spp.



Fonte: MITKOWSKI; ABAWI, 2003.

principais antagonistas utilizados em programas de controle biológico do nematoide das galhas (LUAMBANO *et al.*, 2015). A incorporação de matéria orgânica ao solo também se mostra como uma alternativa bastante promissora para o controle de fitonematoides, uma vez que, além de apresentar compostos com atividade nematicida, esse material ainda favorece o estabelecimento de agentes de controle biológico no solo (MACHADO *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido direcionadas para a identificação de substâncias bioativas que possam ser empregadas no manejo integrado de pragas e doenças, com menor impacto ao ambiente. Dentre as várias moléculas de origem vegetal, as proteínas aparecem como candidatas promissoras para o controle de pragas no campo. Diversos estudos relatam o envolvimento de proteínas de origem vegetal na defesa contra fitonematoides (SANTI-GADELHA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

1.3 Proteínas ligantes à quitina

As plantas estão constantemente expostas à ação de agentes causadores de estresse, que ocasionam efeitos deletérios sobre o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Quanto a sua natureza, esses agentes podem ser divididos em dois grandes grupos: abióticos e bióticos. Altas temperaturas, ventos, baixa umidade, presença de metais pesados no solo, excesso de luminosidade são exemplos de estresse abiótico, enquanto o ataque de pragas e patógenos constitui o estresse de natureza biótica (SOARES; MACHADO, 2007). De modo a minimizar os efeitos deletérios dos diferentes tipos de estresse, as plantas buscam suas defesas físicas, como a cutícula e os espinhos, e químicas, como a síntese de metabólitos primários e secundários (NURNBERGER *et al.*, 2004).

Dentre as moléculas que fazem parte do metabolismo primário, merecem destaque as proteínas, sendo as lectinas, inibidores de proteases, proteínas inativadoras de ribossomos e proteínas ligantes à quitina algumas das mais estudadas. Tais classes de proteínas têm recebido atenção especial em virtude de suas potencialidades de aplicações na agricultura e saúde (GIFONI *et al.*, 2012).

Dando ênfase às proteínas ligantes à quitina, seu envolvimento na defesa da planta sucede do fato de que muitas plantas podem responder ao ataque de pragas e patógenos através da participação de proteínas capazes de se ligar à quitina, um biopolímero formado por monômeros de *N*-acetil-D-glucosamina, unidos por ligações β -1,4, presente na parede celular dos fungos, no exoesqueleto e intestino dos insetos e superfície dos ovos de nematoides. Várias proteínas ligantes à quitina, cuja sequência aminoacídica é conhecida,

contêm um motivo estrutural comum, com muitos resíduos de cisteína e glicina conservados, conhecido como domínio de ligação à quitina ou domínio heveínico (ASENSIO *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de proteínas ligantes à quitina na defesa vegetal contra o ataque de fungos e insetos. Essas proteínas são capazes de afetar o crescimento e desenvolvimento do fungo por causarem distúrbios na síntese e deposição de quitina na parede celular e/ou por interferirem na germinação dos esporos, retardando a germinação (SELITRENNIKOFF, 2001). A atividade inseticida das proteínas ligantes à quitina está relacionada com a interação entre essas proteínas e a quitina presentes na matriz peritrófica dos insetos (COELHO *et al.*, 2009).

Yao e colaboradores (2010) purificaram uma lectina ligante à quitina, denominada SLP, dos rizomas de *Setcreasea purpurea*, um membro da família *Commelinaceae*. A proteína apresentou massa molecular de 48,0 kDa e mostrou elevada similaridade com proteínas pertencentes à família das lectinas ligantes à quitina, contendo o domínio do tipo heveína. SLP mostrou potente atividade inibitória do crescimento dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium italicum* e *Helminthosporium maydis*. Duas lectinas ligantes à quitina também foram purificadas do gênero *Artocarpus*. Ambas apresentaram massa molecular de 14,0 kDa, sendo constituídas por 3 cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto, e mostraram similaridade alta com outras proteínas ligantes à quitina de origem vegetal, tendo sido capazes de inibir o crescimento dos fungos *Fusarium moniliforme* e *Saccharomyces cerevisiae* (TRINDADE *et al.*, 2006).

Além da atividade antifúngica, as proteínas ligantes à quitina também apresentam efeitos deletérios para bactérias e fitonematóides (GORTARI; HOURS, 2008). Um exemplo é a quitinase purificada das sementes de *Phaseolus vulgaris* que, na concentração de 17 µg/mL, ocasionou uma taxa elevada de inibição da eclosão dos ovos de *M. hapla* (MERCER; GREENWOOD; GRANT, 1992). Adicionalmente, a lectina purificada das sementes de *Acacia farnesiana*, denominada AFAL, foi capaz de inibir o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* (Gram-negativa) e *Clavibacter michiganensis* (Gram-positiva), além de prejudicar o desenvolvimento de *M. incognita*. AFAL interage com a casca dos ovos do fitonematoide, que é composta predominantemente por microfibrilas de quitina embebidas em uma matriz proteica, podendo penetrar através dessa estrutura e atuar diretamente na larva em desenvolvimento (SANTI-GADELHA *et al.*, 2012).

1.4 *Moringa oleifera* Lamarck

M. oleifera é uma árvore pertencente à família monogenética *Moringaceae*, nativa do Noroeste da Índia e amplamente cultivada em regiões tropicais como Ásia, África e América do Sul (FAHEY, 2005; ANWAR *et al.*, 2007). No Brasil, onde foi introduzida por volta de 1950, essa espécie é encontrada facilmente na região Nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (MATOS, 1998).

M. oleifera é uma árvore com múltiplas propostas de utilização. De acordo com Foidl, Makkar e Becker (2001), os seus vários usos incluem: produção de biomassa, forragem para animais (folhas e sementes), biogás (a partir de folhas), agente de limpeza doméstica (folhas trituradas), corante azul (madeira), barreira (árvores vivas), fertilizantes (semente), nutriente foliar (suco processado das folhas), adubo verde (de folhas), goma (a partir de troncos de árvores), clarificador de mel e de caldo de cana-de-açúcar (sementes em pó), produção de mel (néctar floral), uso medicinal (todas as partes da planta), plantações ornamentais, celulose (madeira), corda (casca) e para tratamento de peles e bronzeamento (casca e goma). Além das utilizações citadas, o óleo das sementes de *M. oleifera* (rendimento de 30-40%, em peso), também conhecido como óleo de Ben, tem sabor adocicado, não é aderente e nem seca com facilidade, além de ser resistente ao ranço. Este óleo é geralmente usado em saladas, lubrificação de máquinas e na fabricação de perfume e produtos para os cabelos. Além disso, todas as partes desta árvore são comestíveis e o consumo vem sendo estimulado devido ao seu elevado valor nutricional, principalmente as folhas por serem ricas em vitaminas e sais minerais (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; WADHWA *et al.*, 2013).

Apesar da relevância de todas as aplicações anteriormente citadas, a proposta mais comum de utilização desta planta consiste na purificação da água. Sementes de *M. oleifera* possuem agentes ativos de coagulação, caracterizados como proteínas catiônicas de massa molecular em torno de 13,0 kDa e ponto isoelétrico entre 10 e 11 (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Uma proteína catiônica foi isolada de sementes de *M. oleifera*, com massa molecular aparente de 6,5 kDa, rica em resíduos de arginina e prolina e possuindo ponto isoelétrico em torno de 10. Essa proteína mostrou atividade coagulante, cuja propriedade pode ser explicada pela alta densidade de cargas dessa proteína (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995). Adicionalmente, foi reportado que frações enriquecidas de proteínas coagulantes de sementes de *M. oleifera* eram capazes de coagular material em suspensão, além de agregar as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus thurigiensis*, inibindo o

crescimento de tais micro-organismos. Essas proteínas mantiveram-se ativas mesmo quando aquecidas a 96 °C, por 5 horas (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). Outra proteína coagulante, denominada cMoL, foi isolada de extrato salino de sementes de *M. oleifera*, mostrando-se capaz de aglutinar eritrócitos de coelho e do homem. cMoL, além de possuir atividade coagulante similar a do sulfato de alumínio, permaneceu ativa após aquecimento a 100 °C, por 7 horas (SANTOS *et al.*, 2009).

M. oleifera é, normalmente, resistente às pragas e doenças mais frequentes que acometem plantas, possuindo propriedades contra diferentes micro-organismos fitopatogênicos (JABEEN *et al.*, 2008). Um estudo mostrou que sementes de amendoim tratadas com o extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* apresentaram redução significativa na incidência de infecção pelos fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizopus stolonifer* Lind e *Mucor sp* (DONLI; DAUDA, 2003). O extrato das folhas de *M. oleifera*, combinado com *Trichoderma*, preveniu o tombamento e podridão de feijão caupi, causados pelo fungo *Sclerotium rolfsii* (ADANDONON *et al.*, 2006). A farinha das folhas de *M. oleifera* também foi capaz de reduzir a infestação de nematoides das galhas em raízes de pimentão, melhorando parâmetros da planta, tais como altura e número de folhas e frutos por planta, confirmando o seu potencial no manejo desses fitopatógenos (SOWLEY; KANKAM; ADOMAKO, 2013). Adicionalmente, exsudato de sementes de *M. oleifera* mostrou potente atividade contra fitonematoides, causando 100% de mortalidade de indivíduos de *M. incognita* em estágio J2 (SOUSA, 2013).

1.5 Proposta do trabalho

De sementes de *M. oleifera*, foi purificada, por nosso grupo de pesquisa, uma proteína ligante à quitina, denominada *Mo-CBP₃* (*Moringa oleifera chitin-binding protein*) com atividade antifúngica. Essa proteína possui massa molecular aparente de 18,0 kDa que, após tratamento com agente redutor, resulta em duas cadeias distintas com massas moleculares aparentes de 4,1 kDa e 8,1 kDa. Análises por dicroísmo circular revelaram a estabilidade da estrutura secundária de *Mo-CBP₃* a variações de temperatura e pH. A atividade antifúngica de *Mo-CBP₃* não está relacionada à presença de atividade hemaglutinante, quitinásica ou β -1,3 glucanásica. Todavia, é provável que a ação inibitória de *Mo-CBP₃* sobre fungos esteja ligada a sua capacidade de interagir com a quitina, desde que essa proteína não se mostrou ativa para o oomiceto *Pythium oligandrum*, que contém celulose em sua parede celular e, conseqüente,

indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2014).

Dando continuidade aos estudos com *Mo*-CBP₃ na perspectiva de sua aplicação contra fitopatógenos, no presente trabalho buscou-se responder os seguintes questionamentos:

- A atividade antifúngica demonstrada por *Mo*-CBP₃ é espécie-específica? Se negativo, qual seria o seu espectro de ação frente a outros fungos fitopatogênicos de importância agrônômica?
- A estabilidade estrutural demonstrada por *Mo*-CBP₃ a variações de temperatura e pH implicaria, também, na manutenção de sua atividade antifúngica?
- Já que *Mo*-CBP₃ é formada por duas cadeias unidas por ponte dissulfeto, o seu tratamento com agente redutor provocaria alteração na atividade antifúngica?
- *Mo*-CBP₃ além de inibir a germinação de conídios, teria ação deletéria sobre a fase de crescimento micelial?
- A ação antifúngica de *Mo*-CBP₃ é fungistática e/ou fungicida?
- Além de fungos filamentosos, *Mo*-CBP₃ teria ação sobre outro fitopatógeno, por exemplo, nematoides, já que na casca de seus ovos há quitina?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivos avançar na caracterização da atividade antifúngica demonstrada pela proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, *Mo-CBP₃*, e avaliar o seu potencial nematicida sobre o nematoide das galhas.

2.2. Objetivos específicos

- Acumular *Mo-CBP₃* para realização dos ensaios biológicos;
- Avaliar a atividade de *Mo-CBP₃* contra fungos fitopatogênicos de relevância agrícola, incluindo *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*;
- Testar a ação de *Mo-CBP₃* sobre as fases de germinação e crescimento dos fungos;
- Avaliar os efeitos de agentes redutores, da temperatura e do pH sobre a atividade antifúngica de *Mo-CBP₃*;
- Caracterizar a ação antifúngica de *Mo-CBP₃* como fungistática e/ou fungicida;
- Avaliar a ação de *Mo-CBP₃* na eclosão de ovos de nematoides *Meloidogyne* spp.

3 MATERIAIS

3.1 Sementes de *Moringa oleifera*

Sementes de *M. oleifera* foram coletadas, durante todo o ano, de plantas localizadas no Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, Ceará. Um ramo terminal com folhas e frutos foi coletado, prensado e desidratado para fins de identificação e incorporação ao acervo do Herbário Prisco Bezerra da UFC, sob a identificação EAC34591.

3.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* foram provenientes da micoteca do Laboratório de Toxinas Vegetais, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Os fungos foram mantidos em meio Ágar-Batata-Dextrose (BDA) estéril, em câmara de crescimento com umidade entre 40-50%, temperatura 25-27 °C e fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro.

3.3. Reagentes e outros materiais

β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e marcadores de massa molecular de proteínas foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) ou Invitrogen, (Carlsbad, USA).

As matrizes cromatográficas foram obtidas da GE HeathCare (Uppsala, Suécia).

Os meios de cultura ágar batata, ágar nutriente e caldo PD (Potato and Dextrose) foram obtidos da Himedia e Merk (Darmstadt, Alemanha).

Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico, fabricados por empresas reconhecidas e foram obtidos comercialmente.

4 MÉTODOS

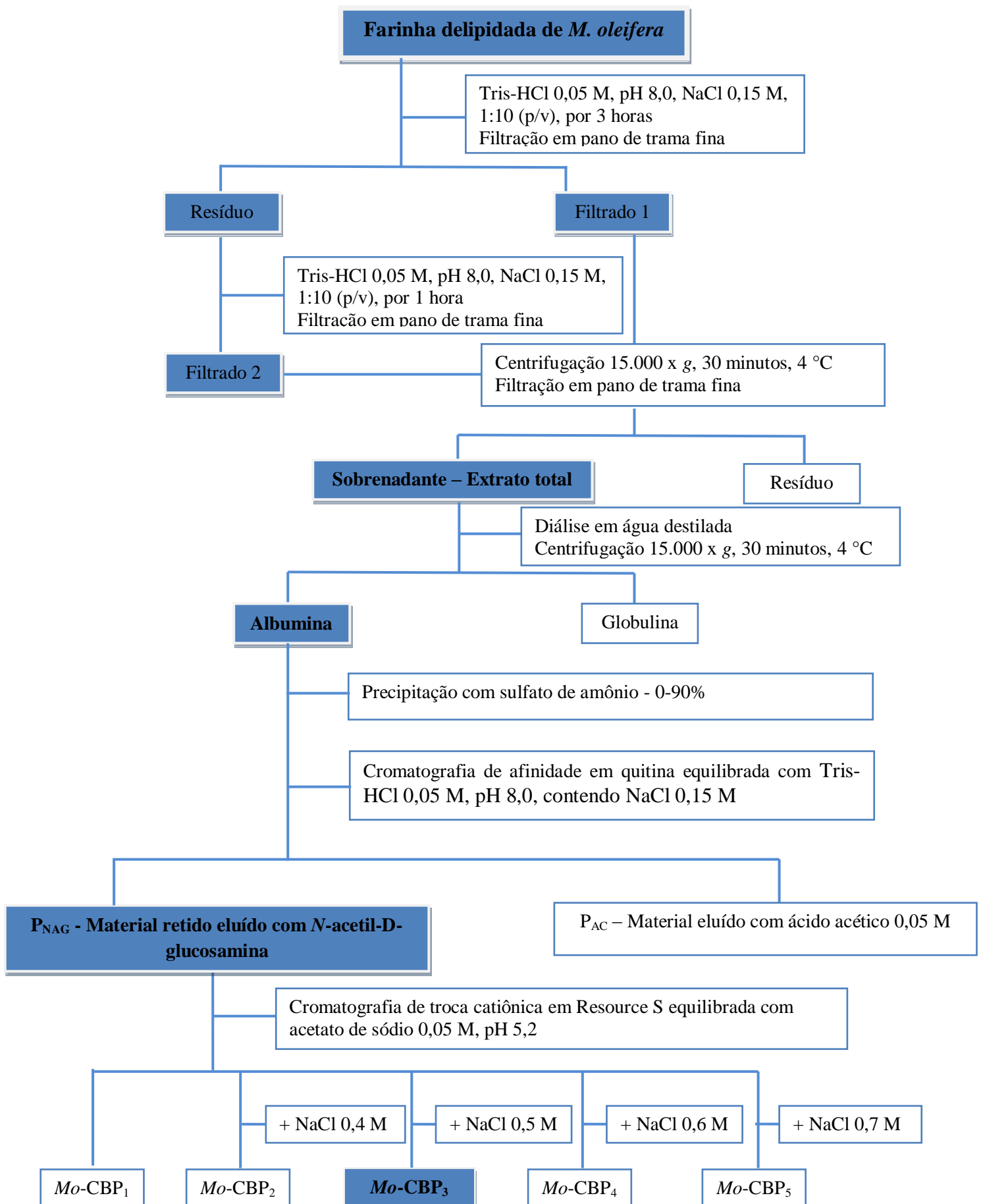
4.1 Processamento das sementes de *M. oleifera*

As sementes de *M. oleifera* foram retiradas de seus frutos, destegumentadas manualmente e as amêndoas trituradas em liquidificador e, posteriormente, em moinho elétrico para café. Em seguida, a farinha foi peneirada em malha de 1,0 mm² e tratada com *n*-hexano, na proporção 1:10 (m/v), à temperatura ambiente, até a completa remoção dos lipídios. O solvente foi desprendido da farinha por evaporação em capela de exaustão à temperatura ambiente. A farinha delipidada foi acondicionada em frascos plásticos hermeticamente fechados e conservada a 4 °C até sua utilização.

4.2 Obtenção da proteína ligante à quitina *Mo*-CBP₃

Para obtenção de *Mo*-CBP₃ foi seguido o protocolo estabelecido por Gifoni *et al.* (2012). Dessa forma, a farinha delipidada de sementes de *M. oleifera* foi submetida à extração em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção de 1:10 (p/v) e mantida sob agitação contínua por 4 horas, a 4 °C (FIGURA 3). O resíduo foi reextraído nas mesmas condições acima, exceto o tempo de agitação que foi apenas de 1 hora. A suspensão foi filtrada em pano de trama fina e o filtrado centrifugado a 15.000 x g, 30 minutos, 4 °C, tendo sido o resíduo descartado e o sobrenadante obtido denominado de extrato total. Esse sobrenadante foi posteriormente dialisado exaustivamente contra água destilada, a 4 °C, no intuito de separar albuminas e globulinas, e a suspensão resultante centrifugada a 15.000 x g, 30 minutos, 4 °C. O sobrenadante, representando a fração albumina, foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, na faixa de 0-90%, deixado em repouso por 12 horas, centrifugado a 15.000 x g, 30 minutos, 4 °C e dialisado contra Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M.

O primeiro passo cromatográfico para obtenção de *Mo*-CBP₃ foi realizado em coluna de afinidade em matriz de quitina. A fração albumina (835 mg) foi ressuspensa em tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M), centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C e aplicada na coluna de quitina (24,5 x 2,1 cm) previamente equilibrada (FIGURA 3). O material não retido foi obtido com o próprio tampão de equilíbrio. O material retido na matriz foi eluído primeiramente com solução de *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M (P_{NAG}) e, em seguida, com ácido acético 0,05 M (P_{AC}). As frações

Figura 3 – Protocolo de obtenção de *Mo*-CBP₃

coletadas (3,5 mL), a um fluxo de 60 mL/hora, foram monitoradas pelas leituras de absorvância a 280 nm.

Como segundo passo cromatográfico, a fração P_{NAG} (15 mg) foi submetida à cromatografia de troca catiônica em matriz de Resource S, acoplada a sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (FIGURA 3). Esse procedimento resultou na obtenção de uma fração não retida ($Mo-CBP_1$) e de quatro frações retidas nomeadas de $Mo-CBP_2$, $Mo-CBP_3$, $Mo-CBP_4$ e $Mo-CBP_5$, as quais foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl 0,4, 0,5, 0,6 e 0,7 M, respectivamente. A cromatografia foi procedida em fluxo de 1 mL/minuto, tendo sido coletadas frações de 2,0 mL, que foram acompanhadas por espectrofotometria a 280 nm.

4.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Bradford (1976). A uma alíquota de 100 μ L das amostras foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorvâncias a 595 nm. A concentração de proteínas foi estimada em relação a uma curva obtida com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA). Alternativamente, as proteínas eluídas nos procedimentos cromatográficos foram avaliadas pelas leituras das absorvâncias a 280 nm.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

Com o intuito de avaliar o grau de pureza de $Mo-CBP_3$, o seu perfil eletroforético foi analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (1%), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0%, na presença ou não de β -mercaptoetanol 1,0%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 10 minutos, centrifugadas a 10.000 x g, 5 minutos, a 10 °C. Os sobrenadantes, acrescentados de cristais de sacarose e azul de bromofenol 0,1%, foram aplicados no gel, o qual foi submetido a uma corrente constante de 20 mA, em sistema vertical (HOEFER SE 250, Amersham Biosciences). Após o término da corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05%, dissolvido em solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v), por aproximadamente 2 horas. Por fim, a solução corante

foi descartada e o gel foi descorado com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v) até que as bandas proteicas fossem claramente evidenciadas.

4.5 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de *Mo*-CBP₃ frente a fungos fitopatogênicos

4.5.1 Manutenção das culturas dos fungos filamentosos

As culturas dos fungos *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* e *C. musae* foram mantidas em meio ágar batata-dextrose (BDA), a 8 °C. O meio de cultura consistiu em 39 g de ágar batata-dextrose (Difco) dissolvidos em 1 litro de água grau Milli-Q, q.s.p., preparado sob banho-maria com água em ebulição, sendo este meio autoclavado por 20 minutos, a 120 °C, 1,5 KGF e distribuído (20 mL) em placas de Petri com 10 cm de diâmetro, nas quais o fungo foi repicado. As culturas dos fungos foram usadas para preparação de *pellets* (discos de 8 mm de diâmetro), feitos com o auxílio de um perfurador esterilizado no centro das placas de Petri, que foram fechadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar.

4.5.2 Extração de conídios dos fungos filamentosos

Para obtenção dos conídios, após os fungos terem tomado todo o diâmetro da placa de Petri, essas foram abertas em câmara de fluxo laminar e adicionados 5 mL de água grau Milli-Q, após o que, com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril manuseada levemente sobre o micélio, os esporos foram liberados, deixando-os suspensos em água. A suspensão de esporos foi coletada com pipeta e filtrada em malha de nylon para remoção das hifas. A suspensão foi lavada, sob centrifugação a 10.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C, para obtenção de esporos, livres de meio. Ao final, os esporos foram quantificados em câmara de Neubauer, com aumento de 400 x, em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60).

4.5.3 Ensaio de inibição da germinação de conídios de fungos fitopatogênicos

A atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃ foi inicialmente avaliada sobre a inibição da germinação de conídios, conforme metodologia descrita por Ji e Kúc (1996), adaptada para

uso de placas de polietileno reticuladas. Alíquotas de 10 μL da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram incubadas com 10 μL de *Mo*-CBP₃ a diferentes concentrações (0,05 e 0,1 mg/mL). Como controle negativo, foi usada H₂O. As placas foram deixadas em recipiente contendo papel de filtro embebido em água destilada e incubadas no escuro, à temperatura ambiente, sendo a análise monitorada a partir de 24 horas em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60). Conídios foram considerados germinados caso apresentassem tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento. Cada tratamento e controle foram realizados em triplicata.

4.5.4 Estabilidade da atividade inibitória da germinação de conídios de *F. solani* frente a agentes desnaturantes físicos e químicos

4.5.4.1 Estabilidade frente a temperaturas elevadas

Dentre os diferentes fungos testados, *F. solani* foi selecionado como modelo experimental, para dar continuidade aos experimentos vinculados à avaliação da ação antifúngica de *Mo*-CBP₃. Esse fungo foi selecionado, por tratar-se de uma espécie de fácil manuseio e crescimento rápido, ideal para ensaios *in vitro*, além de sua relevância agrônômica.

A estabilidade térmica da proteína antifúngica foi avaliada através da incubação de *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL) a diferentes temperaturas, em banho-maria, atingindo um aquecimento máximo de 100 °C, por 60 minutos. Após resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura ambiente, foi procedido o ensaio de inibição da germinação de conídios de *F. solani*, conforme descrito no item 4.5.3. Para o controle negativo foi usado água destilada estéril e para o controle positivo a proteína sem prévio aquecimento foi incubada com os conídios de *F. solani*. O experimento foi realizado em triplicata e fotografias foram obtidas em câmara digital (Sony, modelo MCV-CD350).

4.5.4.2 Estabilidade frente a diferentes valores de pH

No teste de avaliação da estabilidade da proteína antifúngica em diferentes pH, *Mo*-CBP₃ foi ressuspensa no tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M (0,1 mg/mL), ajustado para diferentes valores de pH (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0). Em seguida, amostras de *Mo*-CBP₃ foram submetidas ao ensaio de inibição da germinação de conídios de *F. solani*, conforme

descrito no item 4.5.3. O ensaio foi acompanhado com controles negativos, nos quais conídios de *F. solani* foram incubados com tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M ajustado para os diferentes valores de pH citados, na ausência de *Mo*-CBP₃. Como controle positivo, peróxido de hidrogênio 0,1 M foi usado. Cada tratamento e controle foram realizados em triplicata.

4.5.4.3 Estabilidade frente ao agente redutor ditioneitol

Para avaliar a estabilidade de *Mo*-CBP₃ em presença de agente redutor, alíquotas da proteína (0,1 mg/mL), após redução com ditioneitol (DTT) 0,01 M e alquilação com iodoacetamida 0,03 M, sendo, estes compostos, posteriormente retirados de contato com a proteína através de processo de diálise contra água destilada, foram submetidas ao ensaio de inibição da germinação de conídios de *F. solani*, conforme descrito no item 4.5.3. O ensaio foi acompanhado do controle positivo consistindo da incubação dos conídios com *Mo*-CBP₃ não reduzida. Cada tratamento e controle foram realizados em triplicata.

4.5.5 Ensaio de inibição do crescimento micelial de *F. solani*

O ensaio quantitativo de inibição do crescimento micelial em meio líquido foi realizado segundo metodologia descrita por Broekaert *et al.* (1990). Em placas de poliestireno estéreis (Nunc), de 96 poços, 10 µL da suspensão de conídios (2×10^5 conídios/mL) de *F. solani* foram incubados com 100 µL do meio BDA, na ausência de *Mo*-CBP₃ por, aproximadamente, 12 horas, no escuro, a 37 °C. Em seguida, 100 µL da solução de *Mo*-CBP₃ (0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL) filtrada em membrana estéril (Millipore) de 0,22 mm, foram adicionados. O crescimento celular foi também avaliado na ausência da proteína antifúngica (controle negativo). O crescimento do fungo foi monitorado por turbidimetria a 630 nm, por até 49 horas, usando um leitor de microplacas automático (Modelo Elx800, Bio-Tek® Instruments). Os valores de absorvância lidos imediatamente após a adição de *Mo*-CBP₃ foram estabelecidos como “zero” e subtraídos dos demais valores de absorvância verificados ao longo do experimento. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para evitar contaminações, todo procedimento experimental foi feito em condições assépticas, dentro de uma câmara de fluxo laminar, onde também foi instalado o leitor de microplacas.

4.5.6 Estudo do modo de ação de Mo-CBP₃

Na investigação se a ação antifúngica Mo-CBP₃ seria fungistática e/ou fungicida, foi analisada a viabilidade de conídios de *F. solani* após terem sido submetidos à incubação com diferentes concentrações dessa proteína em placas de microtitulação. Para tanto, alíquotas de 150 µL da suspensão conídios + Mo-CBP₃ foram retiradas dos poços da placa, transferidas para tubos Eppendorf, centrifugadas a 3.000 x g, por 1 minuto, a 25 °C, e o sobrenadante descartado. Os conídios remanescentes foram lavados com água destilada estéril, transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e mantidos incubados a 27 °C. Fotografias do crescimento micelial foram retiradas após cinco dias. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6. Avaliação da atividade nematicida *in vitro* de Mo-CBP₃ frente ao *Meloidogyne spp*

4.6.1 Obtenção dos ovos

Para coleta de ovos de *Meloidogyne spp.* foi seguida a metodologia de Coolen e D'Herde (1972). Os ovos foram obtidos a partir de galhas de raízes de tomateiro, mantidos na Horta do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal do Ceará. As raízes colhidas foram lavadas em água corrente, posteriormente fragmentadas em pedaços de aproximadamente 1 cm e transferidas para o copo do liquidificador, onde foi adicionada solução de hipoclorito de sódio 0,5% até sua cobertura. Em seguida, as raízes foram trituradas por 30 segundos na menor velocidade e a suspensão resultante vertida na peneira de 20 mesh sobre a de 400 mesh. Os ovos retidos na peneira de 400 mesh foram coletados com auxílio de jatos de água provenientes de uma pisseta. A suspensão de ovos foi dividida em tubos de centrífuga, seguida da adição de 1 cm³ de caulim, agitação e centrifugação a 1.800 x g, por 5 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso, acrescido de solução de sacarose 45% e centrifugado sob as mesmas condições anteriores, exceto o tempo que foi de apenas 1 minuto. Posteriormente, o sobrenadante foi vertido em peneira de 400 mesh e os ovos retidos lavados até a eliminação total da sacarose, tendo sido recuperados com auxílio de uma pisseta contendo água. Para os ensaios *in vitro*, a suspensão contendo os ovos foi quantificada em microscópio óptico e calibrada em câmaras de Peters para 160 ovos/mL, usando um estereoscópio (COLEMAN - XTB-2B).

4.6.2 Avaliação do efeito de *Mo-CBP₃* na eclosão de ovos

Para o ensaio de avaliação da eclosão dos ovos, a metodologia seguida foi baseada na metodologia de Campos, Campos e Coimbra (2006). Esse teste foi realizado em câmaras de eclosão montadas em placas de 2 cm de diâmetro com capacidade de 1 mL. Em cada placa, foram incubados 500 µL da suspensão encerrando 80 ovos de *Meloidogyne* spp. com 500 µL de *Mo-CBP₃*, solubilizada em água, nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,5 mg/mL, por até 72 horas, a 28 °C, na ausência de luz. Como controles negativo e positivo foram utilizados água e formol, respectivamente. O número de juvenis foi contado a cada 24 horas após incubação dos ovos com *Mo-CBP₃*, usando um estereoscópio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento.

4.7 Análise estatística

A avaliação estatística dos dados foi realizada através de ANOVA, testes paramétricos e não-paramétricos, sendo considerados como significativos os resultados que apresentaram $p < 0,05$.

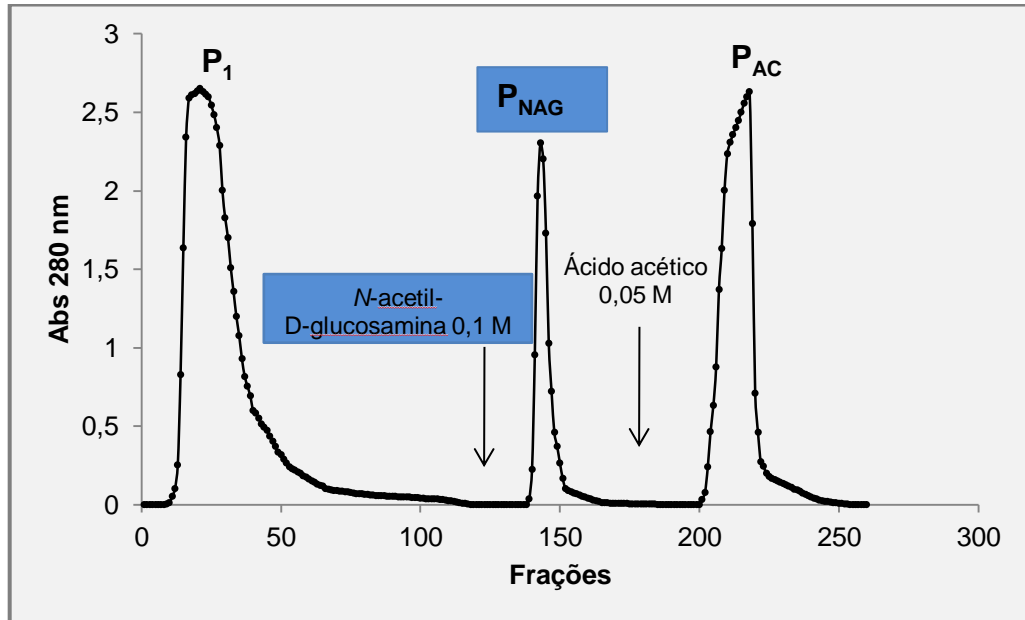
5 RESULTADOS

5.1 Obtenção de *Mo*-CBP₃

Para os objetivos propostos neste estudo, inicialmente, *Mo*-CBP₃ foi purificada e acumulada. O teor médio de proteínas extraídas da farinha de sementes correspondeu a 216,44 mg/g de farinha. O fracionamento dessas proteínas com base na solubilidade em água resultou na obtenção das albuminas (144,71 mg proteína/g de farinha), fonte das proteínas ligantes à quitina. Essa fração proteica quando concentrada com sulfato de amônio a 90% de saturação rendeu um concentrado acumulando 122,33 mg proteína/g de farinha. As albuminas concentradas quando aplicadas na matriz de quitina foram fracionadas em três picos proteicos, dois deles representando as proteínas ligantes à quitina, os quais foram eluídos com solução de *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M e ácido acético 0,05 M, pH 3,0, sendo, assim, denominados pelas siglas P_{NAG} e P_{AC}, respectivamente (FIGURA 4). P_{NAG} foi dialisado contra ácido acético 0,1 M, seguido pela água destilada e liofilizado. A cromatografia de P_{NAG} em matriz Resource S promoveu sua separação em cinco picos proteicos (FIGURA 5), os quais receberam a denominação de *Mo*-CBP (*Moringa oleifera* – *chitin binding protein*), por terem sido oriundos da fração ligante à quitina, acrescida do número (1-5), correspondendo à sequência de liberação da coluna. A proteína em estudo, denominada *Mo*-CBP₃, representa o terceiro pico resultante dessa cromatografia de troca catiônica, o qual foi eluído com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M. O conteúdo obtido de *Mo*-CBP₃ através da estratégia de purificação utilizada foi de 1,17 mg/g de farinha, mostrando uma recuperação de 0,5% das proteínas totais extraídas da farinha de *M. oleifera* (TABELA 1).

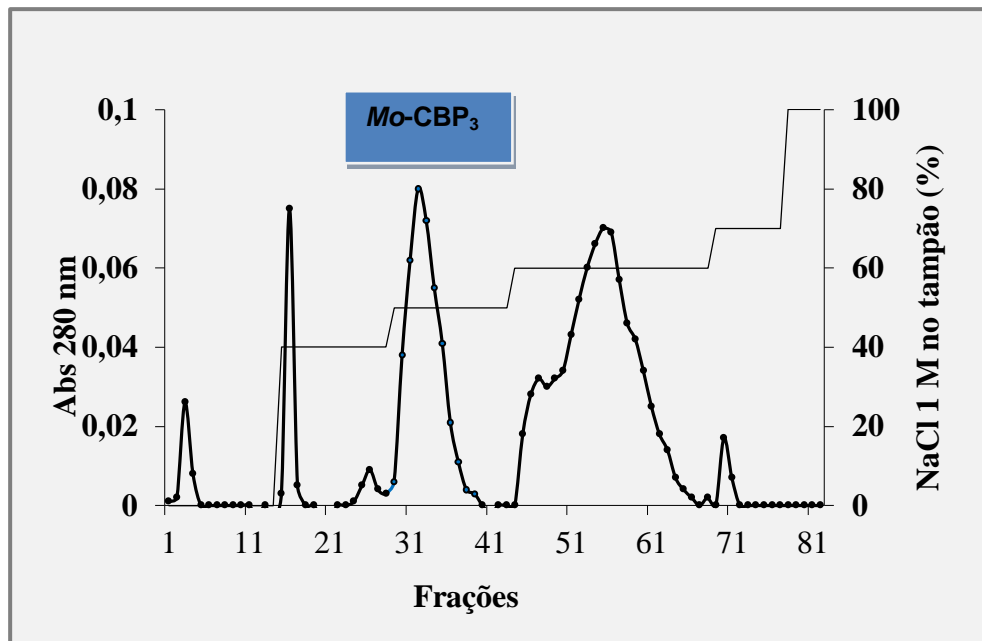
A pureza de *Mo*-CBP₃ foi confirmada por PAGE-SDS (FIGURA 6). Na ausência de β-mercaptoetanol, *Mo*-CBP₃ apresentou-se como uma banda de massa molecular de aparente de 18,0 kDa. Em condições redutoras, *Mo*-CBP₃ mostrou duas cadeias de massas moleculares aparentes de 8,1 kDa e 4,1 kDa.

Figura 4 – Perfil cromatográfico das albuminas de sementes de *M. oleifera* em matriz de quitina



Amostra (835 mg) da fração albumina concentrada com sulfato de amônio (F0-90%), obtida a partir da diálise exaustiva em água do extrato total de sementes de *M. oleifera*, foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina (31,0 x 3,0 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. O material não retido, representando P_1 , foi removido com tampão de equilíbrio. As frações proteicas ligantes à quitina foram eluídas com *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M e ácido acético 0,05 M, tendo sido denominadas de P_{NAG} e P_{AC} , respectivamente. A cromatografia foi realizada a fluxo constante de 60 mL/h e foram coletadas frações de 3,5 mL.

Figura 5 – Perfil cromatográfico das proteínas ligantes à quitina (P_{NAG}) em matriz de Resource S



A fração (15 mg) eluída da matriz de quitina com *N*-acetil-D-glucosamina (P_{NAG}) foi submetida à cromatografia de troca catiônica em matriz de Resource S (1,0 mL), acoplada a sistema de FPLC, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Cinco picos proteicos foram obtidos, o primeiro deles não tendo ficado retido na matriz e os demais eluídos após a adição de 0,4, 0,5, 0,6 e 0,7 M de NaCl ao tampão de equilíbrio. Todos os picos dessa cromatografia receberam a denominação *Mo*-CBP (*Moringa oleifera* – *chitin binding protein*) acrescida do número (1-5), correspondendo à sequência de liberação da coluna. *Mo*-CBP₃, portanto, representa o terceiro pico resultante dessa cromatografia, o qual foi eluído com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M. A cromatografia foi realizada a fluxo constante de 1 mL/h e foram coletadas frações de 2,0 mL.

Tabela 1 – Conteúdo e rendimento de proteína das amostras resultantes em cada etapa do processo de purificação de *Mo*-CBP₃

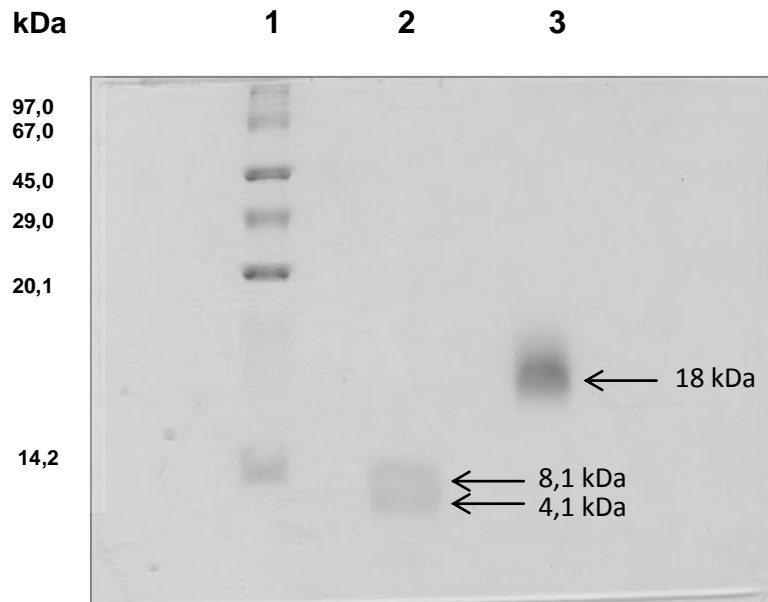
Amostra	Proteína total (mgP/gF) ^a	Rendimento proteico (%) ^b
Extrato total	216,44 ± 4,72	100
Albuminas	144,71 ± 1,74	66,6
F 0-90%	122,33 ± 2,04	56,5
P _{NAG}	6,50 ± 0,38	3,0
<i>Mo</i> -CBP ₃	1,17 ± 0,07	0,5

Os valores representam média e desvio padrão de seis experimentos similares.

^aQuantidade total de proteína recuperada (mg) em cada etapa de purificação, a partir de 1 g de farinha de *M. oleifera*.

^bRendimento de 100% foi atribuído ao extrato total obtido a partir da farinha de sementes de *M. oleifera*. O rendimento foi calculado como sendo a razão entre a quantidade de proteína total em cada etapa de purificação e aquela do extrato total, multiplicada por 100.

Figura 6 – Perfil eletroforético de *Mo*-CBP₃ em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença e ausência do agente redutor β-mercaptoetanol



Raia 1 - Marcadores de massa molecular (fosforilase B - 97,0 kDa; albumina sérica bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa e α -lactalbumina - 14,2 kDa); Raia 2 - *Mo*-CBP₃ na presença de β-mercaptoetanol 1% e Raia 3 - *Mo*-CBP₃ na ausência de β-mercaptoetanol 1%. Foram aplicados 5 μ g do marcador e 10 μ g de *Mo*-CBP₃. As proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,05%.

5.2 Atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃

5.2.1 Inibição da germinação de conídios de diferentes fungos fitopatogênicos causada pela *Mo*-CBP₃

Mo-CBP₃ foi capaz de inibir a germinação de conídios de todos os fungos testados, mostrando seu amplo espectro de ação. *F. solani*, *F. oxysporum* e *R. solani* se mostraram mais suscetíveis, sendo inibidos a partir de 0,05 mg/mL da proteína teste, enquanto *C. musae* e *C. gloesporioides* revelaram-se mais resistentes, sendo necessário 0,1 mg/mL de *Mo*-CBP₃ para inibir sua germinação (FIGURA 7).

5.2.2. Estabilidade funcional de *Mo*-CBP₃

A estabilidade térmica de *Mo*-CBP₃, considerando a manutenção de sua atividade antifúngica, está mostrada na Figura 8. Mesmo a 100 °C, por 60 minutos, *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL) manteve sua capacidade inibitória sobre a germinação de conídios de *F. solani*.

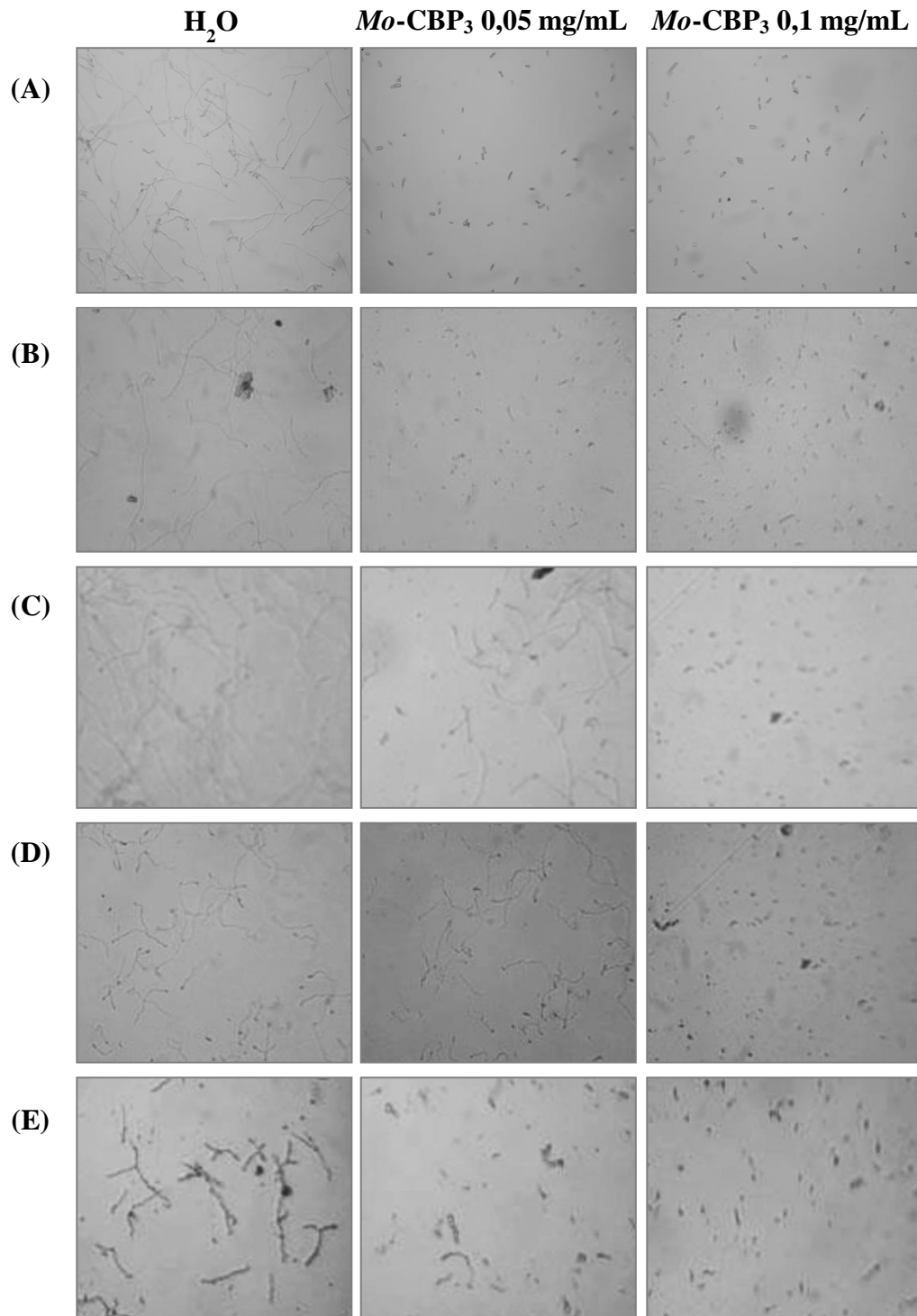
Mo-CBP₃ (0,1 mg/mL) manteve-se funcionalmente estável frente a variação de pH, como está ilustrado na Figura 9. Mesmo após incubação em ampla faixa de pH (4,0 a 12,0), *Mo*-CBP₃ se mostrou capaz de inibir a germinação de conídios de *F. solani*. A pH 2,0, no entanto, é difícil avaliar o comportamento da proteína, visto que a germinação de conídios não foi detectada nem mesmo no controle. Provavelmente, por se tratar de um pH muito ácido.

A redução da proteína exerceu influência negativa sobre a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃. De fato, a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL) foi completamente abolida quando a proteína foi incubada com DTT 0,01 M por 30 minutos (FIGURA 10).

5.2.3 Inibição do crescimento de *F. solani* causada por *Mo*-CBP₃

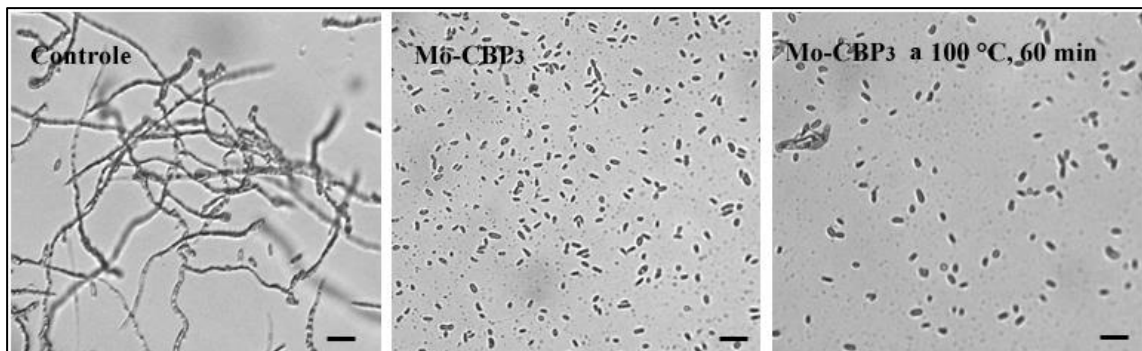
Quando conídios já germinados de *F. solani* foram incubados com *Mo*-CBP₃, inibição do crescimento micelial foi também observada, quando comparado com o respectivo controle, cultivo na ausência da proteína teste (FIGURA 11). A inibição foi traduzida a partir da quantidade de massa micelial produzida (biomassa), medida em termos de absorbância, a 630 nm. A ação inibitória de *Mo*-CBP₃ sobre o crescimento de *F. solani* foi observada mesmo na

Figura 7 – Inibição da germinação de conídios de diferentes fungos fitopatogênicos causada por *Mo*-CBP₃



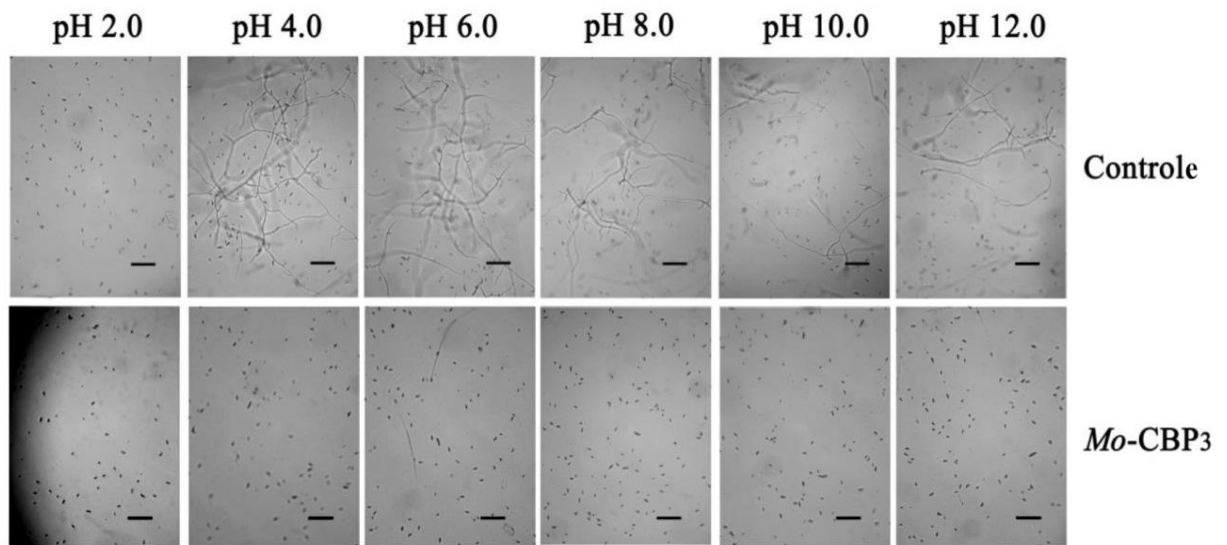
As fotomicrografias correspondem aos conídios de *F. solani* (A), *F. oxysporum* (B), *C. musae* (C), *C. gloesporioides* (D) e *R. solani* (E) incubados com *Mo*-CBP₃ nas concentrações de 0,05 ou 0,1 mg/mL, após 24 horas. Água destilada foi usada como controle negativo. Esporos foram considerados germinados caso apresentassem tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

Figura 8 – Efeito da temperatura sobre a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃



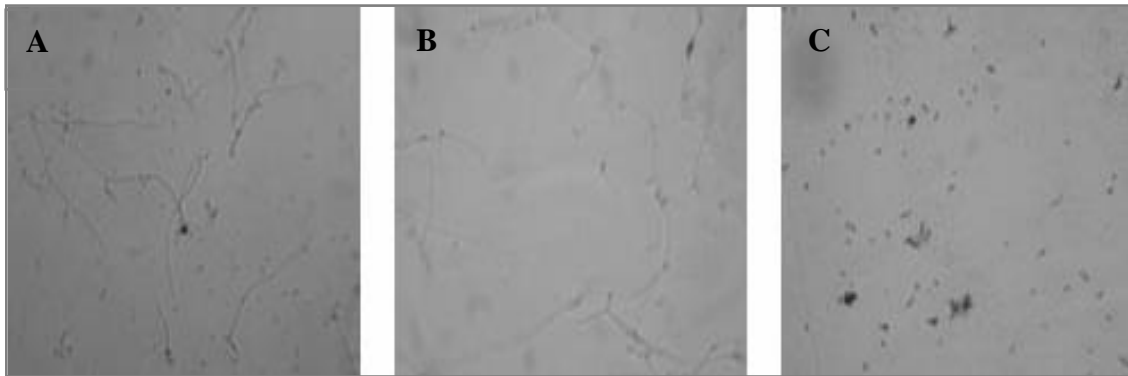
Fotomicrografias em microscópio óptico de conídios de *F. solani* apenas em água (controle) ou incubados com *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL), não tratada ou previamente tratada a 100 °C, por 60 minutos. Barra: 2,5 µm.

Figura 9 – Efeito da variação do pH sobre a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃



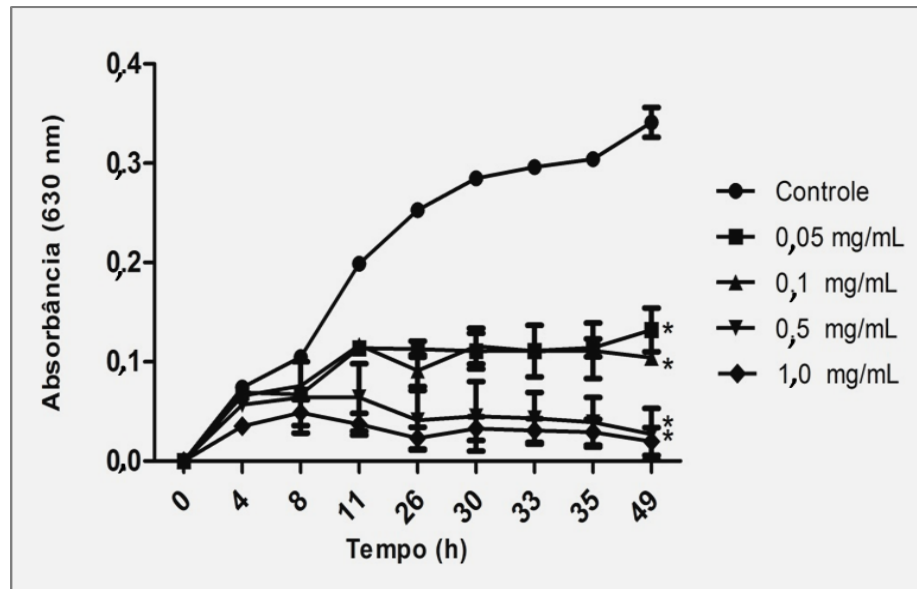
Fotomicrografias em microscópio óptico de conídios de *F. solani* quando incubados ou não com *Mo*-CBP₃ em diferentes condições de pH. Como controle negativo, foi usado o tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M em diferentes valores de pH (2,0 - 12,0). Como teste, *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL) foi solubilizada nesse mesmo tampão, tendo sido também submetida à variação de pH. Barra: 2,5 μm.

Figura 10 – Efeito do agente redutor DTT sobre a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃



Fotomicrografias em microscópio óptico mostrando a germinação ou não de conídios de *F. solani* quando incubados com *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL) tratada ou não com DTT 0,01 M e iodoacetamida 0,03 M. Como controle negativo, foi usado o água destilada. A) H₂O destilada, B) *Mo*-CBP₃ reduzida e alquilada e C) *Mo*-CBP₃ nativa.

Figura 11 – Curvas de crescimento do fungo *F. solani* na presença de *Mo*-CBP₃ em diferentes concentrações



Uma suspensão de conídios (2×10^5 células/mL) foi incubada na ausência de *Mo*-CBP₃ e deixada germinar por 12 horas no escuro a 37 °C. Em seguida, 100 μ L de *Mo*-CBP₃ em diferentes concentrações foram adicionados. Como controle, conídios foram incubados no meio BDA, na ausência de *Mo*-CBP₃. Os valores representam média \pm desvio padrão de triplicata. Asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$) comparada ao grupo controle (Teste de Tukey).

mais baixa concentração proteica testada, que foi 0,05 mg/mL, com uma redução 62% após 49 horas de incubação com a proteína. Nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mg/mL, a inibição causada por *Mo*-CBP₃, também após 49 horas de incubação, foi de 66%, 88% e 95%, respectivamente.

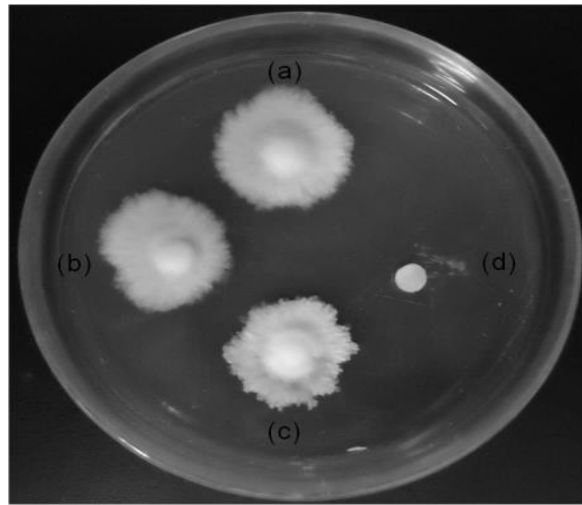
5.2.4 Modo de ação antifúngica de *Mo*-CBP₃

Conídios de *F. solani* que tiveram seu crescimento micelial inibido por conta da presença de *Mo*-CBP₃, quando transferidos para o meio de cultura BDA e incubados a 27 °C, se mostraram capazes de retomar seu crescimento, dependendo da concentração proteica em que foram expostos ao contato. De fato, viabilidade celular foi observada para conídios mesmo incubados com *Mo*-CBP₃ em concentrações de até 0,5 mg/mL, por 49 horas, revelando, assim, uma ação fungistática da proteína em teste. No entanto, *Mo*-CBP₃ na concentração de 1 mg/mL se mostrou letal para tais conídios, demonstrando uma ação fungicida da proteína, quando em concentração mais elevada (FIGURA 12).

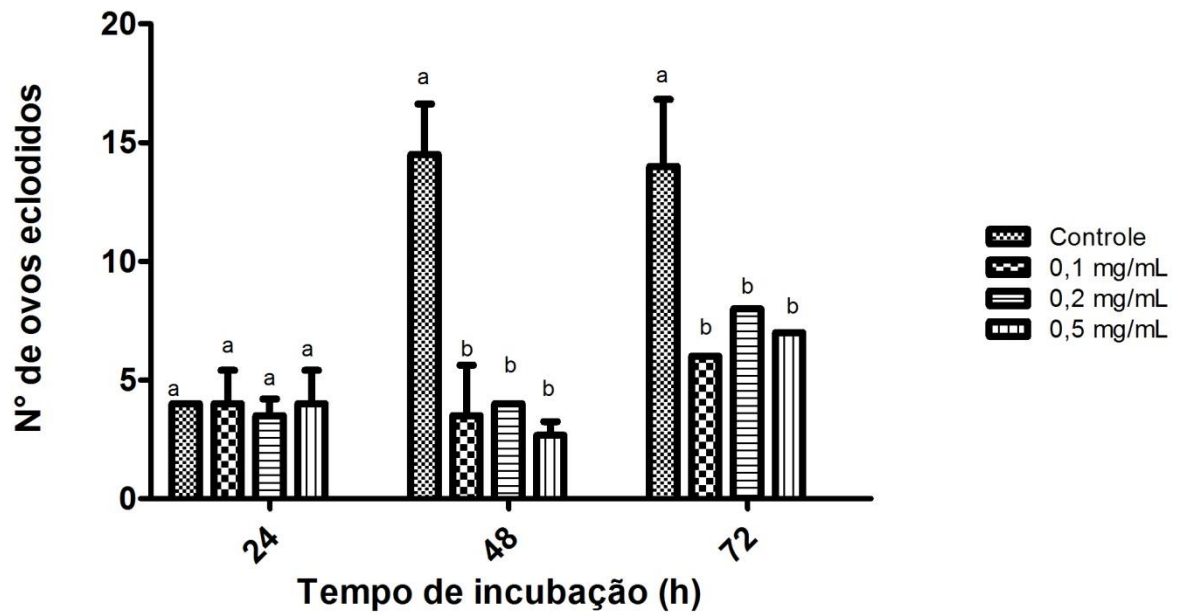
5.3. Atividade nematicida *in vitro* de *Mo*-CBP₃ frente ao *Meloidogyne spp.*

Mo-CBP₃ foi capaz de interferir na eclosão de ovos do nematoide das galhas *Meloidogyne spp.* (FIGURA 13). Ação inibitória sobre a eclosão do ovo foi evidenciada a partir de 48 horas de incubação com *Mo*-CBP₃, havendo uma redução em torno de 76% no número de ovos eclodidos em relação ao controle. Após 72 horas de incubação, ainda esse percentual de redução tenha diminuído, passando para 57%, ele ainda foi bem expressivo. Para ambos os intervalos de tempo analisados, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no número de ovos eclodidos entre as diferentes concentrações testadas de *Mo*-CBP₃.

Figura 12 – Viabilidade de conídios de *F. solani* após incubação com *Mo*-CBP₃ em diferentes concentrações



Para análise da viabilidade celular, conídios remanescentes, após ensaio de avaliação de inibição do crescimento por *Mo*-CBP₃, foram lavados com água destilada estéril, transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e mantidos incubados a 27 °C, por cinco dias. Na placa de Petri, está sendo mostrado o crescimento ou não do fungo *F. solani*, dos conídios previamente submetidos, por 49 horas, nas seguintes condições: (a) Água destilada estéril (controle); (b) *Mo*-CBP₃ 0,1 mg/mL; (c) *Mo*-CBP₃ 0,5 mg/mL e (d) *Mo*-CBP₃ 1 mg/mL.

Figura 13 – Efeito de *Mo*-CBP₃ sobre a eclosão de ovos de *Meloidogyne* spp.

Os valores mostrados através das barras representam o número de ovos eclodidos após os intervalos de 24, 48 e 72 horas em contato com *Mo*-CBP₃ nas concentrações de 0,1, 0,2 ou 0,5 mg/mL. Como controle, ovos foram postos em contato apenas com água destilada. Cada tempo foi analisado separadamente, onde letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle, utilizando o teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Patógenos de plantas são ameaças reais para a agricultura mundial. Perdas de produtividade significativas ocorrem na maioria das espécies agrícolas e hortícolas devido aos ataques de fungos e nematoides (WANI, 2010). Assim, um dos principais desafios da agricultura moderna é conseguir controle eficaz e duradouro para fitopatógenos (COLLINGE *et al.*, 2010). Normalmente, fitopatógenos são controlados através do uso de compostos sintéticos. No entanto, o uso desses produtos químicos é acompanhado por uma série de problemas, tais como diminuição de sua eficácia devido ao surgimento de resistência e efeitos indesejados para o ambiente e à saúde humana (MANCZINGER *et al.*, 2002; PRETTY, 2008). Dentre as principais alternativas aos compostos sintéticos, proteínas de origem vegetal ativas contra fitopatógenos têm despertado a atenção, devido ao seu potencial de aplicação na agricultura e por se tratarem de compostos, na sua maioria, com baixo ou mesmo nenhum impacto sobre o ambiente (BORAD; SRIRAM, 2008; YADAV *et al.*, 2013).

A utilização de moléculas de natureza proteica no combate aos chamados “inimigos vegetais” ganhou impulso com o advento da tecnologia do DNA recombinante. Vários estudos descrevem a eficácia de proteínas bioativas expressas em plantas modelo ou de interesse econômico (LACERDA *et al.*, 2014). Entretanto, para se chegar até a etapa de utilização de uma proteína como arma de defesa vegetal, uma completa avaliação de sua estrutura, estabilidade, modo de ação e biossegurança é essencial. Em consonância com isso, esse trabalho teve como objetivo acumular *Mo*-CBP₃, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, purificada anteriormente por nosso grupo de pesquisa (GIFONI *et al.*, 2012), com a finalidade de investigar sua ação sobre fungos e nematoides fitopatogênicos.

O protocolo de purificação utilizado para obtenção de *Mo*-CBP₃ reproduziu os resultados reportados anteriormente por Gifoni *et al.* (2012) e Batista *et al.* (2014). O teor proteico médio calculado para *Mo*-CBP₃ pura foi 1,17 mgP/gF, o que representa um rendimento de, aproximadamente, 0,5% das proteínas do extrato total, 1% das proteínas da F 0-90%, bem como 18% das proteínas contidas na fração P_{NAG}. Ainda, *Mo*-CBP₃ representa 1,8% das proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *M. oleifera*.

A pureza da proteína purificada foi confirmada por PAGE-SDS, na qual *Mo*-CBP₃ se apresentou como banda única, com massa molecular aparente de 18 kDa, na ausência de agente redutor. Todavia, o tratamento da proteína com β-mercaptoetanol 1% confirmou sua composição heterodimérica, com a presença de duas cadeias polipeptídicas com massas moleculares aparentes de 4,1 e 8,1 kDa, denominadas cadeia A e cadeia B, respectivamente,

ligadas por ponte dissulfeto. Gifoni *et al.* (2012) mostraram que a cadeia A tem o resíduo NH₂-terminal bloqueado, enquanto a cadeia B contém uma sequência NH₂-terminal rica em resíduos de cisteína e glutamina (CPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQ), guardando similaridades com albuminas 2S. As albuminas 2S são proteínas solúveis em água, possuindo, em sua maioria, massa molecular em torno de 12,0 kDa, sendo compostas por duas cadeias polipeptídicas distintas unidas por pontes dissulfeto (GEHRIG *et al.*, 1996).

O conteúdo de cisteína pode ser considerado de grande relevância no estudo das frações das proteínas ligantes à quitina. A presença do aminoácido cisteína em *Mo*-CBP₃ é compartilhada com outras proteínas ligantes à quitina, tais como a aglutinina de gérmen de trigo, WGA (MIRELMAN *et al.*, 1975) e heveína (VAN PARIJS *et al.*, 1991). Acredita-se que a cisteína participe da ligação dessas proteínas à matriz de quitina.

Uma vez comprovada a pureza de *Mo*-CBP₃, proseguiram-se os estudos de avaliação de atividades biológicas *in vitro* envolvendo essa proteína. No presente trabalho, ênfase foi dada inicialmente à caracterização da atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃, propriedade essa previamente reportada por Gifoni *et al.* (2012). Todavia, no presente estudo foi dada uma nova abordagem a análise da atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃, tendo sido um dos enfoques a avaliação de seu espectro de ação testando vários fungos fitopatogênicos. *Mo*-CBP₃ se mostrou capaz de inibir a germinação de conídios de cinco diferentes fungos, compreendendo *F. solani*, *F. oxysporum*, *C. musae*, *C. gloesporioides* e *R. solani*. Isso demonstra que a atividade de *Mo*-CBP₃ não é espécie-específica, já que ela inibiu diferentes espécies de fungos. Esse achado sugere que *Mo*-CBP₃ seja potencialmente capaz de interagir com diferentes patógenos na natureza. Nesse contexto, *Mo*-CBP₃ parece ser uma proteína promissora no uso ao controle de fungos, uma vez que um dos pré-requisitos para essa finalidade é mostrar amplo espectro de ação contra fitopatógenos alvo (PELEGRINI; FRANCO, 2005; SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).

Em relação à potência da atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃, comparando-se as concentrações (0,05 e 0,1 mg/mL) usadas no ensaio de inibição da germinação contra fungos fitopatogênicos com as empregadas em outros estudos, essa proteína é mais potente do que várias proteínas antifúngicas. Por exemplo, as lectinas de soja (SBA) e amendoim (PNA) se mostraram capazes de inibir a germinação de conídios de fungos fitopatogênicos somente na concentração de 5 mg/mL (BARKAI-GOLAN; MIRELMAN; SHARON, 1978).

Ainda que *Mo*-CBP₃ tenha mostrado ação inibitória frente a diversos fungos fitopatogênicos, *F. solani* foi selecionado como modelo experimental para dar continuidade aos ensaios envolvendo a caracterização dessa atividade. Esse fungo *F. solani* foi escolhido

por ter se mostrado bastante sensível à proteína (concentração de inibição de 0,05 mg/mL) e ser de manuseio fácil e desenvolvimento rápido, sendo, portanto, ideal para ensaios “*in vitro*” (ZHANG *et al.*, 2006). Em adição, *F. solani* é uma espécie de alta relevância, visto que é um fungo responsável por perdas severas na agricultura mundial em diversas espécies vegetais (AKRAMI *et al.*, 2012; HAGGAG; EL-GAMAL, 2012).

Testes de estabilidade da proteína são comumente realizados como etapas prévias na investigação de seu potencial biotecnológico. Dentre os diferentes parâmetros analisados, estão avaliações da resistência da proteína a temperaturas elevadas ou variações de pH. Isso se justifica pelo fato de que tais fatores podem afetar a atividade biológica de proteínas, bem como diminuir seu nível de exposição (CAO *et al.*, 2010). No caso da temperatura, *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL), mesmo após tratamento térmico a 100 °C por 60 minutos, manteve a atividade inibitória sobre a germinação dos conídios de *F. solani*. Similarmente, *Mo*-CBP₃ (0,1 mg/mL) permaneceu funcionalmente estável em diferentes pHs (de 4,0 a 12,0), mantendo a atividade inibitória da germinação dos conídios. No entanto, embora a exposição da proteína ao pH 2,0 tenha também sido avaliada, não é possível atestar se *Mo*-CBP₃ permaneceu igualmente ativa, visto que nem mesmo no controle, o qual consistiu da incubação dos conídios nesse pH, porém na ausência da proteína, foi observada germinação. Nesse pH bastante ácido, é possível que a alta concentração de prótons tenha se constituído em uma condição muito adversa para o fungo, impossibilitando sua germinação. Por outro lado, nos demais valores de pH avaliados, é presumível que não tenha havido alteração da carga líquida da proteína, ao ponto de causar repulsão eletrostática e posterior ruptura das pontes de hidrogênio (KWAAMBWA; MAIKOKERA, 2008), tendo sido, então, conservada a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃.

Os resultados aqui obtidos demonstram que *Mo*-CBP₃ possui resistência elevada a variações de temperatura e pH, mantendo sua atividade antifúngica. A estabilidade funcional de *Mo*-CBP₃ pode ser atribuída à presença de resíduos de cisteína em sua estrutura. *Mo*-CBP₃ é uma proteína ligante à quitina e muitas proteínas pertencentes a essa classe, com sequência aminoacídica conhecida, possuem um domínio formado por 43 aminoácidos, com vários resíduos de cisteína e glicina em posições conservadas (BEINTEMA, 1994). De fato, dos 22 resíduos de aminoácidos identificados na sequência NH₂-terminal de *Mo*-CBP₃, 27,3% foram cisteína (GIFONI *et al.*, 2012). Esses resíduos de cisteína poderiam levar à formação de pontes dissulfeto, estabilizando toda a molécula, tornando *Mo*-CBP₃ mais resistente à desnaturação. Osmotinas e proteínas do tipo taumatina apresentam várias pontes dissulfeto, tendo sido sugerido que essas ligações contribuem para a alta estabilidade estrutural e funcional dessas proteínas (FREITAS *et al.*, 2011).

Em concordância com a proposição de que as pontes dissulfeto contribuem para a alta estabilidade funcional de *Mo*-CBP₃, está o fato de que o tratamento da proteína com DTT 0,01 M aboliu, pelo menos em parte, sua atividade antifúngica. A perda dessa atividade se deve, provavelmente, à quebra de pontes dissulfeto, levando ao desarranjo da estrutura tridimensional da proteína. Da mesma forma que ocorreu com *Mo*-CBP₃, uma osmotina purificada do látex de *Calotropis procera* perdeu sua atividade contra fungos fitopatogênicos, quando tratada com agente redutor (FREITAS *et al.*, 2011). Há vários estudos mostrando que a presença de pontes dissulfeto intra- ou intermoleculares são, em grande parte, responsáveis pela estabilidade funcional das proteínas quando submetidas à ação de agentes desnaturantes físicos e químicos (ODDEPALLY; SRIRAM; GURUPRASAD, 2013; RUFINO *et al.*, 2013). As pontes dissulfeto são essenciais para a manutenção da conformação nativa da proteína, conferindo, por sua vez, estabilidade e/ou resistência intrínseca frente a diferentes condições de temperatura, pH e agente redutor (PRASAD; DUTTA-GUPTA; PADMASREE, 2010).

Estabilidade a variações de temperatura e pH parece ser uma propriedade comum quando consideradas proteínas de sementes de *M. oleifera*. A proteína coagulante denominada MO manteve sua atividade floculante mesmo depois de tratada termicamente a 95 °C, por 5 horas. Análises espectroscópicas confirmaram que o calor e pH não se constituíam em fatores capazes de afetar a estrutura secundária de MO (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). Adicionalmente, uma lectina floculante, nomeada cMoL, permaneceu ativa mesmo quando o pH do meio variou de 4,0 – 9,0, ou quando aquecida a 100 °C por 7 horas (SANTOS *et al.*, 2005). Outro exemplo é a hemaglutinina denominada MoL, que manteve sua conformação nativa e capacidade de aglutinar eritrócitos, quando submetida a variações de pH e temperatura (KATRE *et al.*, 2008).

O próximo passo foi avaliar se *Mo*-CBP₃ também teria ação sobre a fase de crescimento micelial do fungo, uma vez que mudanças na constituição de sua parede celular podem ocorrer em seus diferentes estágios de desenvolvimento (HARDHAM; MITCHELL, 1998). Nesse ensaio, *Mo*-CBP₃ foi utilizada nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL. Já na menor concentração testada, *Mo*-CBP₃ se mostrou capaz de inibir em 62% o crescimento micelial de *F. solani*. Em concentrações superiores (0,5 e 1,0 mg/mL), a ação antifúngica de *Mo*-CBP₃ foi ainda mais rápida e pronunciada. Por exemplo, *Mo*-CBP₃ a 1 mg/mL, 26 horas após sua incubação, levou a uma taxa de inibição do crescimento de *F. solani* de 95%. Há diversos trabalhos tratando da capacidade de proteínas ligantes à quitina de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos (BROEKAERT *et al.*, 1989; CIOPRAGA *et al.*, 1999; TRINDADE *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2014). A lectina ligante à quitina de

Setcreasea purpurea (SPL) causou inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Penicillium italicum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Helminthosporium maydis* na concentração de 1,51 mg/mL (YAO *et al.*, 2010).

Considerando as concentrações de *Mo*-CBP₃ aqui usadas, e comparando-as com aquelas de outras proteínas antifúngicas que também tiveram ação sobre o crescimento micelial, torna-se difícil fazer qualquer tipo de generalização sobre a potência de tais macromoléculas, particularmente por conta do modo de ação que pode ser diferenciado. Por exemplo, comparando-se o efeito das proteínas heveína e UDA, isoladas de *Hevea brasiliensis* e *Urtica dioica*, respectivamente, sobre o fungo *Botrytis cinerea*, foi observado serem necessários 500 µg/mL de heveína e 40 µg/mL de UDA para inibir 50% de seu crescimento, embora ambas tenham afinidade pelo ligante *N*-acetil-D-glucosamina. Já para o fungo *Phycomyces blakesleeanus*, são requeridos 300 µg/mL e 100 µg/mL de heveína e UDA, respectivamente, para produzir a mesma taxa de inibição (VAN PARIJS *et al.*, 1992). Dessa forma, é possível que além da interação da proteína com o monossacarídeo integrante do polímero quitina, haja outras ligações envolvidas.

Após ter sido verificada ação inibitória de *Mo*-CBP₃ sobre o crescimento micelial, a viabilidade celular dos conídios remanescentes foi avaliada, visando uma melhor compreensão sobre o modo de ação dessa proteína, ou seja, se ela estaria exercendo uma ação fungicida (irreversível) ou fungistática (que de forma reversível, deixa o fungo se desenvolver se retirada do meio). Assim sendo, conídios remanescentes, após exposição a *Mo*-CBP₃ por 49 horas, quando transferidos para o meio de cultura isento da proteína se mostraram capazes de recuperar o crescimento micelial, dependendo da concentração proteica testada. Isso foi verificado para concentrações de *Mo*-CBP₃ até 0,5 mg/mL, demonstrando uma ação fungistática da proteína, o que significa ser ela capaz de inibir o crescimento de *F. solani*, porém de forma não letal. Ao contrário, a incubação de conídios com *Mo*-CBP₃ a 1 mg/mL aboliu (100% de inibição) sua viabilidade, já que o crescimento do fungo não foi retomado, mesmo a proteína estando ausente, caracterizando uma ação fungicida. Isso leva à conclusão que *Mo*-CBP₃ possui modo de ação fungistática e fungicida, dependendo da concentração usada. Esse comportamento é bem conhecido para vários compostos que apresentam atividade antifúngica (FABRY; OKEMO; ANSORG, 1996; BANIHASHEMI; ABIVARDI, 2011; AL-RAHMAH *et al.*, 2013).

O presente trabalho, além de buscar compreender a ação antifúngica de *Mo*-CBP₃, teve como objetivo adicional avaliar a ação dessa proteína sobre o fitopatógeno *Meloidogyne* spp., também conhecido como nematoide das galhas. Esse interesse adveio do fato de que tais

parasitas acarretam problemas a diversas culturas importantes, com distribuição geográfica ampla e prejuízos crescentes, estimulando a adoção de novas medidas de controle, particularmente que possam favorecer a sustentabilidade do agroecossistema (ATKINSON; URWIN; MCPHERSON, 2003). Além disso, não há tantos trabalhos relacionando proteínas ligantes à quitina e ação nematicida, diferentemente do que tem sido observado com fungos fitopatogênicos.

Atividade nematicida já havia sido previamente relacionada à espécie *M. oleifera* (CLAUDIUS-COLE; AMINU; FAWOLE, 2010; ISMAIL, 2013; SOUSA, 2013). Em um desses trabalhos, também realizado por nosso grupo de pesquisa, foi verificado que o exsudato de sementes de *M. oleifera*, na dose de 8 µgP/J2 de *M. incognita*, tratado termicamente (98 °C, 30 minutos) ou não, causou 100% de letalidade dos nematoides. Nesse exsudato, foram detectados compostos pertencentes tanto ao metabolismo primário (inibidor de tripsina, inibidor de papaína, protease, quitinase e proteínas ligantes à quitina), como ao secundário (saponinas e esteroides) (SOUSA, 2013). Apesar dessa observação, a atividade nematicida de *Mo*-CBP₃ pura não foi avaliada.

No presente estudo, *Mo*-CBP₃ mostrou-se capaz de inibir a eclosão de ovos de *Meloidogyne* spp. Uma maior redução no número de ovos eclodidos, em torno de 76%, foi observada após 48 horas de incubação dos ovos com *Mo*-CBP₃. Esse percentual de inibição decresceu para 57% quando o tempo de incubação passou para 72 horas, provavelmente devido a um retardo na eclosão dos ovos. Apesar do tempo de incubação ter influenciado na ação nematicida de *Mo*-CBP₃, o mesmo não foi verificado em relação às diferentes concentrações proteicas testadas (0,1, 0,2 e 0,5 mg/mL), visto a inexistência de diferença significativa ($P > 0,05$) nos respectivos números de juvenis eclodidos. É possível que, mesmo na concentração mais baixa testada, isto é, 0,1 mg/mL, *Mo*-CBP₃ tenha alcançado seu teto de inibição. Assim, seria interessante a realização de experimentos adicionais, incluindo concentrações inferiores a 0,1 mg/mL, a fim de ver se nessas condições a resposta seria dose dependente.

A ação inibitória de *Mo*-CBP₃ na eclosão dos ovos de *Meloidogyne* spp. é bastante interessante, uma vez que esse é um dos estágios mais resistente do ciclo de vida do patógeno, visto à presença de uma casca de três camadas (MENNAN; CHEN; MELAKEBERHAN, 2006). Provavelmente, essa atividade de *Mo*-CBP₃ decorre de sua capacidade de ligar-se à quitina, já que este polissacarídeo é o principal componente da casca de ovos de nematoides (MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003; RITZINGER; FRANCELLI, 2006). A quitina é um polissacarídeo com função estrutural, conferindo, inclusive, proteção aos ovos de

fitonematoides. Assim, é possível que a interação de *Mo*-CBP₃ com a quitina resulte na desestabilização desse polímero de proteção, interferindo na eclosão dos ovos.

Ação nematicida também foi demonstrada por quitinases, outra classe de proteínas com afinidade pela quitina. Tem sido proposto que essas enzimas através de sua ligação à quitina e, conseqüente, hidrólise, findam desgastando as camadas dos ovos de nematóides, resultando na maior flexibilidade dessa estrutura e, conseqüente, deformação. Isso pode, por exemplo, acarretar a eclosão prematura do ovo, comprometendo, assim, o seu desenvolvimento (GAN *et al.*, 2007; SHARMA; PANDEY, 2009; YANG *et al.*, 2013). Em tomateiros transgênicos, superexpressando o gene da quitinase PjCHI-1 de *Paecilomyces javanicus*, a infecção com *M. incognita* resultou na diminuição da quantidade de quitina em seus ovos, acarretando aumento de permeabilidade e embriogênese anormal (CHAN *et al.*, 2010).

Independentemente das propriedades inerentes de cada fitopatógeno aqui avaliado, um dado a ser destacado é a significativa ação antifúngica e nematicida de *Mo*-CBP₃ na mesma concentração, ou seja, 0,1 mg/mL, tanto para fungos, como para nematoides. Uma vez que essa proteína se liga à quitina, e esse polímero está presente na parede celular dos fungos e na casca do ovo de nematoides, é bastante provável que os efeitos adversos causados por *Mo*-CBP₃ sejam primariamente decorrentes de sua interação com estruturas alvo presentes nas superfícies desses fitopatógenos.

7 CONCLUSÃO

Mo-CBP₃ é uma proteína ligante à quitina capaz de inibir a germinação e o crescimento de fungos fitopatogênicos. Sua ação antifúngica é de amplo espectro, resistente às mudanças de temperatura e pH, suscetível ao agente redutor ditioneitol, e fungistática ou fungicida, dependendo da concentração utilizada. *Mo-CBP₃* também possui atividade nematicida, mostrando habilidade para inibir a eclosão de ovos do nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp. Os dados obtidos demonstram o potencial biotecnológico de *Mo-CBP₃* no controle de doenças causadas por fungos e nematoides fitopatogênicos de relevância agrícola.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANDONON, A.; AVELING, T. A. S.; LABUSCHAGNE, N.; TAMO, M. Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium*-caused cowpea damping-off and stem rot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, p. 409-418, 2006.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5. ed. Elsevier-Academic Press, Amsterdam, 2005.
- AIRES, R. S.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, H. S.; SIQUEIRA, S. J.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of 27 kDa 1,3- β -D-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1219-1223, 2012.
- AL-RAHMAH, A. N.; MOSTAFA, A. A.; ABDEL-MEGEED, A.; YAKOUT, S. M.; HUSSEIN, S. A. Fungicidal activities of certain methanolic plant extracts against tomato phytopathogenic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 517-524, 2013.
- AKRAMI, M.; KHIAMI, H. K.; SHIKHLINSKI, H.; KHOSHVAGHTEI, H. Bio controlling two pathogens of chickpea *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* by different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma virens* under field condition. **International Journal of Agricultural Science Research**, v. 1, p. 41-45, 2012.
- ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*, a food plant with multiple medicina uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.
- ARAÚJO, D. D. Manejo de *Meloidogyne incognita* raça 1 em *Passiflora morifolia*. **Dissertação. Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal**, Universidade Estadual de Santa Cruz. 65 p., 2009.
- ASENSIO, J. L.; CAÑADA, F. J.; SIEBERT, H. C.; LAYNEZ, J.; POVEDA, A.; NIETO, P. M.; SOEDJANAAMADJA, U. M.; GABIUS, H. J.; BARBERO, J. J. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalente fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemistry & Biology**, v. 7, p. 529-543, 2000.
- ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E.; MCPHERSON, M. J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 615-639, 2003.
- AUNPAD, R.; PANBANGRED, W. Cloning and characterization of the constitutively expressed chitinase C gene from a marine bacterium, *Salinivibrio costicola* strain 5SM-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 529-536, 2003.
- BANIHASHEMI, Z.; ABIVARDI, C. Evaluation of fungicidal and fungistatic activity of plant essential oils towards plant pathogenic and saprophytic fungi. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 245-256, 2011.

BARKAI-GOLAN, R.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Studies on growth inhibition by lectins of penicillia and aspergilli. **Archives of Microbiology**, v. 116, p. 119-124, 1978.

BASSETO, M. A.; CERESINI, P. C.; VALÉRIO FILHO, W. V. Severidade da mela da soja causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em função de doses de potássio. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 56-62, 2007.

BATISTA, A. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; GIFONI, J. M.; PEREIRA, M. L.; ALMEIDA, M. G. G.; GOMES, V. M.; Da CUNHA, M.; RIBEIRO, S. F. F.; DIAS, G. B.; BELTRAMINI, L. M.; LOPES, J. L. S.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. New insights into the structure and mode of action of *Mo*-CBP₃, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. **Plos One**, v. 9(10), e111427.

BEINTEMA, J. J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. **FEBS Letters**, v. 350, p. 159-163, 1994.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98 p. 426-438, 2011.

BORAD, V.; SRIRAM, S. Pathogenesis-related proteins for the plant protection. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 22, p. 189-196, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F.; VAN PARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, p. 1100-1102, 1989.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; COIMBRA, J. L. Efeito de exsudato radicular de *Brachiaria decumbens* e do sorgoleone de *Sorghum bicolor* no desenvolvimento de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 30, p. 59-65, 2006.

CANTU, D.; GREVE, L. G.; LABAVITCH, J. M.; POWELL, A. L. T. Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. **Micological Research**, v. 113, p. 1396-1403, 2009.

CAO, S.; HE, X.; XU, W.; RAN, W.; LIANG, L.; LUO, Y.; YUAN, Y.; ZHANG, N.; ZHOU, X.; HUANG, K. Safety assessment of Cry1C protein from genetically modified rice according to the national standards of PR China for a new food resource. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 474-481, 2010.

CARRIS, L. M.; LITTLE C. R., STILES, C. M. Introduction to Fungi. **The Plant Health Instructor**, 2012.

CHAN, Y.-L.; CAI, D.; TAYLOR, P. W. J.; CHAN, M. -T.; YEH, K. W. Adverse effect of the chitinolytic enzyme PjCHI-1 in transgenic tomato on egg mass production and embryonic development of *Meloidogyne incognita*. **Plant Pathology**, v. 59, p. 922-930.

CHRISTENSEN, A. B.; CHO, B. H.; NAESBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDEÑA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, p. 135-144, 2002.

CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; TUDOR, R.; BREZUICA, L.; DOYLE, R. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, p. 424-432, 1999.

CLAUDIUS-COLE, A. O.; AMINU, A. E.; FAWOLE, B. Evaluation of plant extracts in the management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. **Mycopathologia**, v. 8, p. 53-60, 2010.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D. L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

COLLINGE, D. B.; JØRGENSEN, H. J. L.; LUND, O. S.; LYNGKJÆR, M. F. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 269-291, 2010.

COLOMBO, G.; MELI, M.; CAÑADA, J.; ASENSIO, J. L.; BARBERO, J. J. A dynamic perspective on the molecular recognition of chitoooligosaccharide ligands by hevein domains. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1039-1049, 2005.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent, State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77p.

CORBANIL, R. Z.; ATLOÉ, J.; MAZZONETTO, F.; DALRI, A. B.; SOSSAI, V. L. M.; PIZETTA, L. C. Efeito de óleos essenciais sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* in vitro. **Revista Agrarian**, v. 3, p. 194-199, 2010.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **Fungal Biodiversity**. Vol. 1, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands, 2009.

CUI, Y.; BELL, A. A.; JOOST, O.; MAGILL, C. Expression of potential defense response genes in cotton. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 25-31, 2000.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 414-430, 2012.

DHEKNEY, S. A.; LI, Z. T.; AN AMAN, M.; DUTT, M.; TATTERSALL, J.; GRAY, D. J. Genetic transformation of embryogenic cultures and recovery of transgenic plants in *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia* and *Vitis hybrids*. **Acta Horticulturae**, v. 738, p. 743-748, 2007.

DONLI, P.; DAUDA, H. Evaluation of aqueous Moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. **Pest Management Science**, v.59, p. 1060-1062, 2003.

- ECHEVERRIGARAY, S.; ZACARIA, J.; BELTRÃO, R. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, v. 100, p. 199-203, 2010.
- EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Tecnologias para a produção de soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 201p.
- FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSORG, R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. **Mycoses**, v. 39, p. 67-70, 1996.
- FAHEY, J. D. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v.1, p. 5, 2005.
- FERRAZ, S.; DIAS, C. R.; FREITAS, L. G. Controle de nematoides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. (ed). **Manejo integrado-fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Editora UFV, Viçosa, p.1-52, 2001.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Manejo sustentável de fitonematóides. Viçosa: UFV, 2010.
- FOIDL, N.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: **The Miracle Tree/The Multiple Attributes of Moringa**, Ed. Lowell J Fuglie, CTA. USA, 2001.
- FREITAS, C. D. T.; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; OLIVEIRA, R. S. B; OLIVEIRA, J. T. A.; RAMOS, M. V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2501–2507, 2011.
- GAN, Z.; YANG, J.; TAO, N.; LIANG, L.; MI, Q.; LI, J.; ZHANG, K.-Q. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1309–1317, 2007.
- GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.
- GEHRIG, P. M.; KRZYZANIAK, A.; BARCISZEWSKI, J.; BIEMANN, K. Mass spectrometric amino acid sequencing of a mixture of seed storage proteins (napin) from *Brassica napus*, products of a multigene family. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 93, p. 3647-3652, 1996.
- GHEBREMICHAEL, K. A.; GUNARATNA; K. R., HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, v. 39, p. 2338-2344, 2005.

- GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 98, p. 406-415, 2012.
- GONZALEZ, M.; PUJOL, M.; METRAUX, J. P.; GONZALEZ-GARCIA, V.; BOLTON, M. D.; BORRÁS-HIDALGO, O. Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 209-216, 2011.
- GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. **Mycology Progress**, v. 7, p. 221-238, 2008.
- HAGGAG, K. H. E.; EL-GAMAL, N. G. In vitro study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* isolates causing the damping off and root rot diseases in tomatoes. **Nature and Science**, v. 10(11), 2012.
- HARDHAM, A. R.; MITCHELL, H. J. Use of molecular cytology to study the structure and biology of phytopathogenic and mycorrhizal fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 24, p. 252-284, 1998.
- HASHEM, M.; ABO-ELYOUSR, K. A. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. **Crop Protection**, v. 30, p. 285-292, 2011.
- HASSAN, M. A.; PHAM, T. H.; SHI, H.; ZHENG, J. Nematodes threats to global food security. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science**, v. 63, n. 5, p. 420-425, 2013.
- HUANG, L.; GILL, B. S. An RGA-like marker detects all known Lr21 leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 1007-1013, 2001.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=418895>> Acesso em: 11 set. 2014.
- ISMAIL, A. E. Feasibility of growing *Moringa oleifera* as a mix-crop along with tomato for control of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* in Egypt. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 60, p. 1-5, 2013.
- JABEEN, R.; SHAHID, M.; JAMIL, A.; ASHRAF, M. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, p. 1349-1358, 2008.
- JAHN, T. L.; JAHN, F. F. **How to Know the Protozoa**. Dubuque: Wm C. Brown, 1949.
- Jl, C.; KÚC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.

- KATRE, U. V.; SURESH, C. G.; KHAN, M. I.; GAIKWAD, S. M. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203-207, 2008.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**, 10. ed. Wallingford, UK: CABI, 2008.
- KWAAMBWA, H. M.; MAIKOKERA, R. Infrared and circular dichroism spectroscopic characterisation of secondary structure components of a water treatment coagulant protein extracted from *Moringa oleifera* seeds. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 64, p. 118–125, 2008.
- LACERDA, A. F.; VASCONCELOS, E. A. R.; PELEGRINI, P. B.; GROSSI DE SA, M. F. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers Microbiology**, v. 5, p. 1-10, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.
- LATGE´, J. P.; BEAUVAIS, A. Functional duality of the cell wall. **Current Opinion in Microbiology**, v. 20, p. 111–117, 2014.
- LEE, J.; PARK, J. J.; KIM, S.; YIM, J.; AN, G. Mutations in the rice liguleless gene result in a complete loss of the auricle, ligule and laminar joint. **Plant Molecular Biology**, v. 65, p. 487-499, 2007.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell Publishing Ltd, Iowa, 2006.
- LI, Y.-H.; QI, X.-T.; CHANG, R.; QIU, L.-J. Evaluation and utilization of soybean germplasm for resistance to cyst nematode in China. In: Sudaric A, editor. **Soybean molecular aspects of breeding**. Shanghai: InTech; p. 373-396, 2011.
- LUAMBANO, N. D.; MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; KIMENJU, J. W.; POWERS, S. J.; NARLA, R. D.; WANJOHI, W. J.; KERRY, B. R. Effect of temperature, pH, carbon and nitrogen ratios on the parasitic activity of *Pochonia chlamydosporia* on *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 80, p. 23-29, 2015.
- LUGINBUHL, S. A class project for PP728 soil borne pathogens, fall 2010. Disponível em: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm>. Acesso em: 11 set. 2014.
- MACE, E. S.; PHONG, D.; UPADHYAYA, H.; CHANDRA, S.; CROUCH, J. H. SSR analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases. **Euphytica**, v. 152, p. 317-330, 2006.
- MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A.; CANEDO, E. J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e esterco bovino. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 590-596, 2013.

MANCZINGER, L.; ANTAL, Z.; KREDICS, L. Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains (a review). **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 49, p. 1-14, 2002.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades**, p. 220, 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998.

MENNAN, S.; CHEN, S. Y.; MELAKEBERHAN, H. Effects of *Hirsutella minnesotensis* and N-Viro soil on populations of *Meloidogyne hapla*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 233-246, 2006.

MERCER, C. F.; GREENWOOD, D. R.; GRANT, J. L. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* chitwood (nematoda: tylenchida). **Nematologica**, v. 38, p. 227-236, 1992.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Insect chitin synthases: review. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 4393-4412, 2003.

MIRELMAN, D.; GALUN, E.; SHARON, N.; LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. **Nature**, v. 256, p. 414-416, 1975.

MITKOWSKI, N. A.; ABAWI, G. S. Root-knot nematodes. **The Plant Health Instructor. Revised 2011**, 2003.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, p. 703-710, 1995.

NUNES, H. T. N.; MONTEIRO, A. C.; POMELA, A. W. V. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p.403-409, 2010.

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

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5544–5550, 2005.

ODDEPALLY, R.; SRIRAM, G.; GURUPRASAD, L. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry**, v. 96, p. 26-36, 2013.

OLIVEIRA, J. T. A.; ANDRADE, N. C.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; SOARES, A. A.; GONDIM, D. M. F.; ARAÚJO-FILHO, J. H.; FREIRE-FILHO, F. R.; VASCONCELOS, I. M. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 145-152, 2012.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Purification and characterization of Bowman-Birk proteinase inhibitor from the seeds of Black gram (*Vigna mungo*). **Phytochemistry**, v. 71, p. 363-372, 2010

PRETTY, J. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 363, p. 447-465, 2008.

RAMACHANDRAN, D.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, v. 34, p. 276-283, 1980.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 331-338, 2006.

RUFINO, F. P.; PEDROSO, V. M. A.; ARAÚJO, J. N.; FRANÇA, A. F. J.; RABÊLO, L. M. A.; MIGLIOLLO, L.; KIYOTA, S.; SANTOE, E. A.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA, A. S. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 70-76, 2013.

SANTI-GADELHA, T.; ROCHA, B. A. M.; GADELHA, C. A. A.; SILVA, H. C. CASTELLON, R. E. R.; GONÇALVES, F. J. T.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA M. H.; SOUZA, A. J. F.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, J. L.; JOAZEIRO, P. P.; CAVADA, B. S. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 15-22, 2012.

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975-980, 2005.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

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

SHARMA, P.; PANDEY, R. Biological control of root-knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 564-567, 2009.

SIDDIQUI, Y.; ALI, A.; NAIDU, Y. Histopathological changes induced by *Meloidogyne incognita* in some ornamental plants. **Crop Protection**, v. 65, p. 216-220, 2014.

SINGH, A.; KIRUBAKARAN, S. I.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, v. 56, p. 100-109, 2007.

SILVA, J. G. P. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do cerrado e hospedabilidade de plantas nativas a *Meloidogyne javanica*. **Dissertação, Programa de Pós-graduação em Fitopatologia**, Universidade de Brasília. 63 p., 2012.

SMITH, J. D. Assessment of spring wheat accessions for disease reaction to *Rhizoctonia solani* AG-8 in controlled environment and direct seeded field evaluations. **Crop Science**, v. 43 p. 694-700, 2002.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, p. 9-19, 2007.

SOUSA, A. J. S. Caracterização do exsudato de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e investigação de seu papel na defesa do vegetal. **Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFC, Fortaleza**, 89p., 2013.

SOWLEY, E. N. K.; KANKAM, F.; ADOMAKO, J. Management of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) on sweet pepper (*Capsicum annum* L.) with moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaf powder. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, p.1531-1538, 2014.

TRINDADE, M. B.; LOPES, J. L. S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; BELTRAMINI, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-264, 1991.

VAN PARIJS, J.; JOOSEN, H. M.; PEUMANS, W. J.; GEUNS, J. M.; VAN LAERE, A. J. Effect of the *Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. **Archives of Microbiology**, v. 158, p. 19-25, 1992.

WADHWA, S.; PANWAR, M. S.; SAINI, N.; RAWAT, S. S.; SINGHAL, S. A review on commercial, traditional uses, phytoconstituents and pharmacological activity of *Moringa oleifera*. **Global Journal of Traditional Medicinal Systems**, v. 2, p. 1-13, 2013.

WANI, S. H.; HAIDER, N.; KUMAR, H.; SINGH, N. B. Plant Plastid Engineering. **Current Genomics**, v. 11, p. 500-512, 2010.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to Fungi**. Cambridge University Press, New York, 2007.

WHITTAKER, R. H. New Concepts of Kingdoms of Organisms. **Science**, v. 163, p. 150-160, 1969.

YADAV, S.; TOMAR, A. K.; YADAV, R. N.; YADAV, S. Screening of antifungal proteins from plants of Cucurbitaceae family against *Fusarium oxysporum*: Potential as biofungicides. **International Research Journal of Environment Sciences**, v. 2, p. 91-96, 2013.

YANG, J.; YU, Y.; LI, J.; ZHU, W.; GENG, Z.; JIANG, D.; WANG, Y.; ZHANG, K-Q. Characterization and functional analyses of the chitinase-encoding genes in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Archives of Microbiology**, v. 195, p. 453-462, 2013.

YAO, Q.; WU, C. F.; LUO, P.; XIANG, X. C.; LIU, J. J.; MOU, L.; BAO, J. K. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1477-1485, 2010

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; AMEENA NALIM, F.; SUMMERBELL, R. C.; PADHYE, A. A.; GEISER, D. M. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the Environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2186-2190, 2006.