

**TEGUMENTOS DE SEMENTES COMO BARREIRAS QUÍMICAS DE
DEFESA CONTRA O ATAQUE DO INSETO *Callosobruchus*
maculatus E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL - 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**TEGUMENTOS DE SEMENTES COMO BARREIRAS QUÍMICAS DE
DEFESA CONTRA O ATAQUE DO INSETO *Callosobruchus
maculatus* E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL - 2007

**TEGUMENTOS DE SEMENTES COMO BARREIRAS QUÍMICAS DE
DEFESA CONTRA O ATAQUE DO INSETO *Callosobruchus*
maculatus E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 10 de abril de 2007.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. José Roberto da Silva – UNIG

Prof^a. Dr^a. Valdirene Moreira Gomes – UENF

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Machado Freire – ISECENSA

Prof^a. Dr^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira – UENF
Orientadora

**Ao Mestre dos mestres, Jesus Cristo,
Honra, glória e louvor sejam dados a Ele.**

**À minha amada família,
Por grande amor e estímulo.**

**A Gustavo,
Por todo companheirismo
e amor.**

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Elenir por ter sido uma orientadora sempre atenciosa e presente. Agradeço por sua paciência, amizade e confiança em mim depositada.

Ao Prof. José Xavier-Filho e à Profa. Kátia Valevski Sales Fernandes pelas contribuições neste trabalho.

Aos Professores Maria da Graça Machado Freire, José Roberto da Silva e Valdirene Moreira Gomes por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

À Professora Marília Amorim Berbert de Molina por aceitar ser a revisora deste trabalho.

À Prof^a. Valdirene Moreira Gomes pelas inúmeras contribuições durante e minha pós-graduação e colaboração nos ensaios com os fungos.

À Prof^a. Olga Lima Tavares Machado por gentilmente ter colaborado no seqüenciamento.

À Prof^a. Maura da Cunha pela colaboração e auxílio nos ensaios imunohistoquímicos.

À doutora Adriana Uchôa, com quem muito aprendi no decorrer deste trabalho. Muito obrigada pela paciência, pelas valiosas sugestões e também pelo cuidado na manutenção da colônia dos insetos.

À doutoranda Izabela Santos por gentilmente ter cedido o anticorpo contra quitinase e a quitinase de ~~A. ghanii e a pavonina~~.

Às grandes amigas do grupo: Elane, Amanda, Simone, Sheila, Alice, Jamile, Iara Daniela e Karla.

Aos colegas de laboratório: Adriana, Luciana, Patrícia, Fábio, Natália, Lucilene, Cassiana, Márcio, Rodrigo e Flávia, pelo agradável convívio no ambiente de trabalho.

Aos colegas do LFBM: Marta, Izabela, Suzana, Ana Paula e André por toda ajuda nos experimentos com os fungos.

Aos técnicos do LQFPP: Cristóvão, Sheila, Jucélia e Izabela por contribuírem para o bom andamento deste trabalho.

Às técnicas do LBCT: Giovana Alves e Beatriz Ferreira pela contribuição nos experimentos de microscopia.

A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação acadêmica e na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1- Sementes	1
1.1.1-Tegumento de sementes de legumes	2
1.2- Mecanismo de defesa de sementes	6
1.2.1- Proteínas tóxicas	6
1.2.2- Participação do tegumento nos mecanismos de defesa	9
1.3- <i>Glycine max</i>	10
1.3.1- Proteínas do tegumento da semente de soja	11
1.4- O bruquídeo <i>Callosobruchus maculatus</i>	14
2. OBJETIVOS	16
2.1- Objetivo geral	16
2.2- Objetivos específicos	16
3. MATERIAL	17
3.1- Material biológico	17
3.1.1- Sementes	17
3.1.2- Insetos	17
3.1.3- Microrganismos	17

3.2- Reagentes	18
4. MÉTODOS	19
4.1- Ensaio biológico com sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes naturais	19
4.2- Obtenção das farinhas dos tegumentos das sementes	21
4.3- Ensaio biológico com sementes artificiais contendo farinha do tegumento de sementes naturais	21
4.4- Extração de proteínas do tegumento e fracionamento com sulfato de amônio	22
4.5- Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose	22
4.6- Atividade biológica das frações não retida (DI) e retida (DII) obtidas na cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose	22
4.7- Dosagem de proteínas	23
4.8- Eletroforese em gel de poliacrilamida	23
4.9- Seqüenciamento de aminoácidos	23
4.10-Ensaio de atividade fosfatásica em gel	24
4.11-Análise da atividade peroxidásica nas frações do tegumento de soja	24
4.12-“Western Blotting”	25
4.13-Dosagem de vicilina pelo método de ELISA	26
4.14-Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100	26
4.15-Atividade biológica das frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100	27
4.16-Dosagem de quitinase pelo método de ELISA	27
4.17-Determinação da atividade peroxidásica	27
4.18-Determinação da atividade inibitória de tripsina	28

4.19-Localização de quitinase nas larvas de <i>C. maculipes</i>	28
4.19.1-Preparação do material de rotina para microscopia de luz	28
4.19.2- Preparação do material para imunohistoquímica em resina Unicryl	29
4.19.3- Imunohistoquímica	29
4.20- Atividade biológica de frações protéicas sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos	30
5. RESULTADOS	31
5.1- Experimentos de sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes naturais.....	31
5.2- Experimentos de sementes artificiais com a farinha de tegumento de sementes	35
5.3- Perfil cromatográfico da fração precipitada 0-90% do tegumento de soja em coluna de troca iônica em DEAE-Sepharose	37
5.4- Toxicidade das frações não retida (DI) e retida (DII) obtidas na cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose para <i>C. maculipes</i>	39
5.5- Caracterização das proteínas presentes no tegumento de soja	39
5.6- Detecção de vicilinas nas frações do tegumento de <i>G. max</i>	40
5.7- Dosagem de vicilina pelo método de ELISA	44
5.8- Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 da fração DII..	44
5.9- Toxicidade das frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 para <i>C. maculipes</i>	47
5.10-Dosagem de quitinase pelo método de ELISA	47
5.11-Atividade peroxidásica	51
5.12-Atividade inibitória de tripsina	51
5.13-Microscopia de luz para rotina das larvas de <i>C. maculipes</i> crescidas em sementes artificiais	54
5.14-Imunohistoquímica	54

5.15-Toxicidade das frações cromatográficas sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Anatomia do tegumento da semente de <i>Glycine max</i> (soja) analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura.	5
Figura 2	Sementes de <i>Glycine max</i> . A, sementes íntegras; B, sementes sem tegumento; C, tegumento.	13
Figura 3	Fêmea de <i>Callosobruchus maculatus</i> infestando sementes de <i>Glycine max</i> .	15
Figura 4	Sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes naturais de <i>Canavalia ensiformis</i> (A) e <i>Glycine max</i> (B).	20
Figura 5	Experimentos de sementes artificiais cobertas com tegumento natural das sementes de <i>Glycine max</i> cv EPACE-10 (controle), <i>Glycine max</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> sp, <i>Dalmanella</i> <i>alutacea</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i> (cultivares manteiga vermelho, vermelho e manteiga).	33
Figura 6	Massa das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> desenvolvidas nos experimentos de sementes artificiais cobertas com tegumento natural de <i>Glycine max</i> (cv EPACE-10) e <i>Glycine max</i> .	34
Figura 7	(A) Valores de WD_{50} (concentração que diminui em 50% a massa das larvas) e (B) Valores de LD_{50} (concentração que diminui em 50% o número de larvas) para os tegumentos das sementes de <i>Glycine max</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> sp, <i>Dalmanella alutacea</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i> (cultivares manteiga vermelho, vermelho e manteiga).	36
Figura 8	Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose da fração precipitada 0-90% com sulfato de amônia do tegumento de soja.	38
Figura 9	Atividade biológica das frações não retida (A) e retida em DEAE-Sepharose eluída com NaCl 0,25 M (B).	41
Figura 10	(A) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% das proteínas presentes no tegumento de soja. (B) Atividade peroxidásica em membrana de nitrocelulose de proteínas separadas em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS. (C) Atividade fosfatásica em gel de poliacrilamida nativo 15%. (D) Detecção de quitinase na fração DII através de "Western blotting". (E) Seqüência parcial de aminoácidos da proteína de 24 kDa da fração DIII.	42

Figura 11	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS (A) e detecção de vicilina por “Western blotting” (B) na farinha do tegumento de soja e na fração precipitada com sulfato de amônio (0-90% de saturação).	43
Figura 12	Dosagem de vicilina na farinha do tegumento, precipitado 0-90% e frações da DEAE-Sepharose. Resultados expressos em concentração de vicilina (ng) por µg proteína (A) e percentagem de vicilina nas frações (B).	45
Figura 13	Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 da fração DII obtida em DEAE-Sepharose.	46
Figura 14	Atividade biológica das frações obtidas em Sephacryl S-100. Massa de uma larva (A) e Percentagem de sobrevivência das larvas (B).	48
Figura 15	Dosagem de quitinase no precipitado 0-90%, fração DII e frações da Sephacryl S-100.	49
Figura 16	Dosagem de quitinase em tegumento das sementes: <i>Canavalia ensiformis</i> (Ce), <i>Acanthosphenia pavonina</i> (Ap), <i>Dalmanella</i> (Da), <i>Albizia</i> (A), <i>Phaseolus vulgaris</i> cv EPACE-10 (Vu), <i>Glycine max</i> (Gm), <i>Phaseolus vulgaris</i> cv manteiga (Pvm), <i>Phaseolus vulgaris</i> cv vermelho (Pvv) e <i>Phaseolus vulgaris</i> cv preto (Pvp).	50
Figura 17	Atividade peroxidásica da fração DII (DEAE-Sepharose) e das frações da Sephacryl S-100.	52
Figura 18	Atividade triptica das frações do tegumento de soja obtidas em DEAE-Sepharose.	53
Figura 19	Corte histológicos de larvas de <i>C. maculipes</i> mantidas em sementes artificiais controle (preparadas apenas com farinha de EPACE-10), corados por azul de toluidina.	55
Figura 20	Cortes histológicos de larvas de <i>C. maculipes</i> mantidas em sementes artificiais contendo 1% da fração S-3.	56

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Efeito das frações obtidas após cromatografia em DEAE-Sepharose sobre o crescimento dos fungos filamentosos <i>Asa um o y spo um e asa um tie i um.</i>	60

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BAPNA	N-benzoil-DL-arginina <i>p</i> -nitroanilida
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	Diaminobenzidina
DEAE	Dietil aminoetil
DI	Fração não retida em DEAE-Sepharose
DII	Fração retida em DEAE-Sepharose eluída com cloreto de sódio 0,25 M.
DIII	Fração retida em DEAE-Sepharose eluída com cloreto de sódio 0,5 M.
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
EPACE-10	Genótipo de gna-ung-4 <i>A. taeniorhynchus</i> susceptível ao gorgulho
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilodalton
LD ₅₀	Concentração da fração protéica que diminui o número de larvas a 50% do número de larvas do controle.
LTP	Proteína transportadora de lipídio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão fosfato salina
<i>p</i> -NPP	Para-nitrofenilfosfato
S-1	Primeiro pico obtido da Sephacryl S-100
S-2	Segundo pico obtido da Sephacryl S-100
S-3	Terceiro pico obtido da Sephacryl S-100
S-4	Quarto pico obtido da Sephacryl S-100
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N’N’N’ tetrametiletilenodiamino
Tris	Tris-hidroximetil amino etano
WD ₅₀	Concentração da fração protéica que diminui a massa da larva a 50% da massa do controle.

RESUMO

As fêmeas do bruquídeo *Callosobruchus maculatus* põem seus ovos no tegumento da semente. O tegumento é a primeira barreira que o inseto precisa atravessar antes de alcançar os cotilédones, onde completará o seu ciclo de vida, o que representa um evento crítico por causa das características físicas e da toxicidade desse tecido. Neste trabalho, estudamos a influência do tegumento na capacidade das larvas de *C. maculatus* em penetrar algumas sementes e analisamos a participação de proteínas presentes no tegumento de *Glycine max* (soja) e seus possíveis potenciais defensivos contra o inseto e fungos fitopatogênicos. A toxicidade do tegumento foi estudada utilizando um sistema de sementes artificiais cobertas com tegumentos naturais. Após 20 dias, a toxicidade foi avaliada determinando a massa e a taxa de sobrevivência das larvas comparadas com larvas controle. Nossos resultados mostraram que os tegumentos de *G. max*, *Abutilon* sp., *Datura stramonium*, *Canavalia ensiformis* e *Phaseolus vulgaris* (manteiga vermelho, vermelho e manteiga) interferiram no desenvolvimento das larvas. A presença de proteínas tóxicas no tegumento de *G. max* foi analisada. Foram identificadas proteínas do tipo vicilina, fosfatase, quitinase, além de atividades peroxidásica e inibitória de tripsina. Frações do tegumento de soja tiveram sua atividade biológica testada para *C. maculatus* através de um sistema de sementes artificiais e foram capazes de reduzir consideravelmente a massa das larvas. DII (fração obtida em DEAE-Sephrose), S-1 e S-3 (frações obtidas em Sephacryl S-100) foram as mais tóxicas, com valores de WD_{50} de 1,14%, 0,9% e 1,65%, respectivamente. Através de experimentos de ELISA, quantificamos quitinase nas frações do tegumento de soja (precipitado, DII, S-1, S-2, S-3, S-4) e na farinha do tegumento de algumas sementes. Apenas a fração S-4 e a farinha de *Abutilon* sp. não apresentaram proteínas imunorreativas com o anticorpo anti-quitinase. Observamos a presença de quitinases nos órgãos das larvas de *C. maculatus* mantidas em sementes artificiais contendo 1% da fração S-3. Ensaio para inibição de fungos mostraram que as frações da DEAE-Sephrose foram capazes de inibir o crescimento de *Fusarium triseptatum* e *Fusarium oxysporum*. Esses resultados sugerem que proteínas tóxicas do tegumento de *G. max* podem ser responsáveis pela resistência dessas sementes a *C. maculatus* e a fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

The bruchid *Callosobruchus maculatus* females attach their eggs to the seed coat. The seed coat is the first barrier that the insect needs to cross before reaching the cotyledons, where it will complete its life cycle, which represents a critical event because of the physical characteristics and toxicity of this tissue. In this work we studied the influence of the seed coat in the capacity of the *C. maculatus* larvae to penetrate some seeds and analyzed the participation of proteins present in the *Glycine max* (soybean) seed coat and their possible defensive potentials against the insect and phytopathogenic fungi. The toxicity of seed coat was studied by using an artificial seed system covered with natural seed coats. After 20 days, the toxicity was evaluated by determining the mass and rate of survival of larvae compared with control larvae. Our results shown that the seed coats of *G. max*, *Albizia* sp, *Dalmanella* sp, *Canavalia ensiformis* and *Phaseolus vulgaris* (“red butter”, “red” and “butter”) interfered in the larval development. The presence of toxic proteins was analyzed in *G. max* seed coat. Vicilin like, phosphatase and chitinase proteins and peroxidase and trypsin inhibitory activities were identified. Soybean seed coat fractions had their biological activities tested against *C. maculatus* through an artificial seed system and they were able to reduce the mass of the larvae considerably. DII (fraction obtained on DEAE-Sephacryl S-100), S-1 and S-3 (fractions obtained on Sephadex S-100) were the most toxic, with values of WD_{50} of 1.14%, 0.9% and 1.65%, respectively. By ELISA assays we quantified chitinase in the fractions of the soybean seed coat (precipitate, DII, S-1, S-2, S-3 and S-4) and in the flour of the seed coat of some seeds. Only the fraction S-4 and the flour of *Albizia* sp. did not present immunoreactive proteins for the anti-chitinase antibody. We observed the presence of chitinases in the organs of the larvae of *C. maculatus* maintained in artificial seeds with 1% of the fraction S-3. Assays for fungi inhibition showed that DEAE-Sephacryl fractions were able to inhibit the *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* growth. These results suggest that toxic proteins of the *G. max* seed coat may be responsible for resistance of these seeds to *C. maculatus* and to phytopathogenic fungi.

1. INTRODUÇÃO

Com a descoberta de que uma semente posta no solo originava uma planta, que posteriormente produziria muitas sementes e que isso representava uma fonte de alimentação mais segura, o homem modificou seus hábitos nômades, tornando-se sedentário. Desta forma, as sementes foram consideradas pedras fundamentais para a edificação das civilizações (Kozlowski, 1972).

A utilização de sementes como alimento pelo homem foi certamente estímulo para o início da atividade agrícola (Xavier-Filho, 1993), a qual tem sua produção mundial limitada por doenças e pestes de plantas. Pragas e agentes causadores de doenças como fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos causam perdas tanto no rendimento como na qualidade dos produtos agrícolas. O controle de pestes e doenças de plantas é normalmente obtido por meios

tiv(s)Tf Om10416 Tc 52.4'

Além disso, é influenciada por diferentes práticas culturais e condições ambientais (Bewley e Black, 1994). As proteínas constituem um valioso componente de reserva nas sementes da maioria das espécies de plantas. A soja é uma das poucas espécies conhecidas em que a quantidade de proteínas é maior do que a de lipídios ou carboidratos. A grande maioria das proteínas de sementes maduras está metabolicamente inativa e serve somente como reserva para ser utilizada para o crescimento do embrião durante a germinação (Copland e McDonald, 1985).

1.1.1- Tegumento de sementes de leguminosas

O tegumento é a estrutura externa que delimita a semente, sendo formado por camadas de células originadas dos integumentos do óvulo. Sua estrutura depende de características específicas do óvulo e das modificações sofridas pelos integumentos do óvulo durante o desenvolvimento e maturação da semente, principalmente características relacionadas à espessura e arranjo do tecido vascular (Kozlowski, 1972).

Os tegumentos de sementes de leguminosas como *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) e *Pisum sativum* (ervilha) são relativamente complexos. Entretanto, ainda faltam informações sobre a diferenciação e o desenvolvimento de células e tecidos específicos dos tegumentos. O desenvolvimento do tegumento de *G. max* é um dos poucos que tem sido examinado em detalhe (Miller *et al.* 1999).

A estrutura do tegumento de sementes varia entre espécies e variedades. Especialmente entre espécies de *Glycine* e *Phaseolus*, o tegumento é bastante similar entre espécies diferentes, consistindo de quatro camadas: cutícula encerada, epiderme, hipoderme e o parênquima interior (Swanson *et al.* 1985). Na Figura 1 é mostrada a anatomia do tegumento de semente de *G. max*, como exemplo (Cassab *et al.* 1985). Exteriormente, o tegumento apresenta as seguintes estruturas: hilo, micrópila, rafe e região chalazal.

A camada mais externa do tegumento é a cutícula encerada, que representa a primeira barreira à embebição (Figura 1B), e possui espessura variável. Na verdade, duas camadas de depósitos de cera, uma muito estável e a outra ambientalmente lábil, são sugeridas para sementes de soja (Souza e Marcos-Filho, 2001).

A epiderme origina-se da camada celular externa do tegumento externo (Zeng *et al.* 2004). É composta de uma camada de células paliçádicas de paredes espessas, denominadas macroesclereídeos, dispostas de forma alongada perpendicularmente à superfície da semente (Figura 1A e 1B). Apenas uma camada paliçádica é encontrada, exceto sob o hilo, onde se encontram duas (Souza e Marcos-Filho, 2001). A pigmentação do tegumento está localizada principalmente na camada paliçádica, constituindo-se de antocianos nos vacúolos, clorofila nos plastídios

A próxima camada mais interna é o endosperma (Figura 1A). As camadas de células endospermicas adjacentes ao embrião degeneram-se e

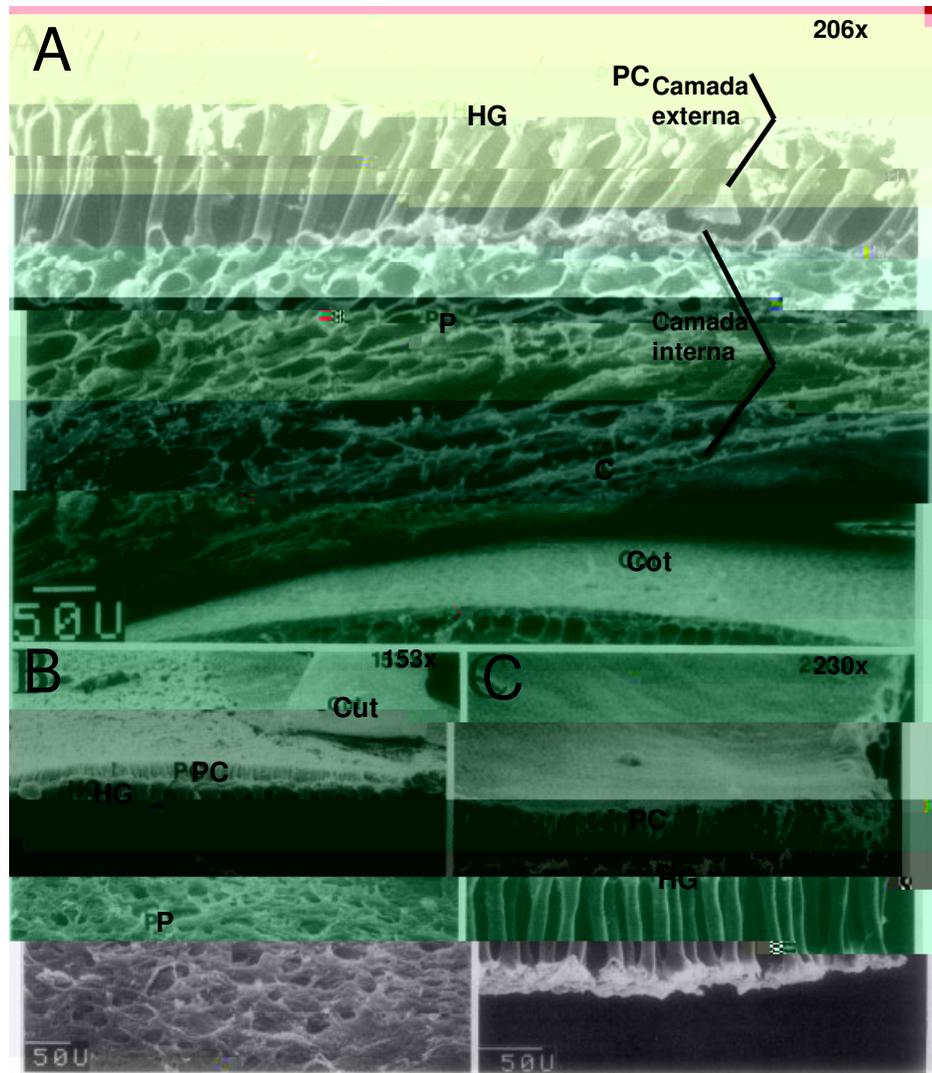


Figura 1 – Anatomia do tegumento da semente de *Glycine max* (soja) analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura. PC, células paliçádicas; HG, células ampulhetas; P, parênquima; C, células comprimidas; Cot, cotilédone; Cutícula, A, Secção do tegumento inteiro. B, Camada externa e um fragmento da cutícula. C, Camada externa isolada do tegumento. Fonte: Adaptado de Cassab *et al.* (1985).

1.2 – Mecanismos de defesa de sementes

As plantas têm selecionado, sob pressão evolutiva, vários mecanismos e estratégias de proteção para solucionar problemas de defesa e enfrentar o estresse do ambiente em geral (Rhoades, 1979; Kogan, 1986).

As defesas de plantas podem ser agrupadas, de acordo com a natureza do mecanismo envolvido, em 2 principais grupos: (1) defesas estruturais, que são aquelas que atuam como barreiras físicas, e previnem contra o ataque de insetos e a penetração de patógenos; e (2) defesas químicas, que envolvem a ação de componentes tóxicos a pestes e patógenos, inibindo o desenvolvimento dos mesmos (Agrios, 1988).

As defesas podem ainda ser classificadas como induzidas ou constitutivas. Estas são do primeiro tipo quando sintetizadas em resposta a estímulos ambientais, como por exemplo, a mastigação de uma folha de tomate por uma lagarta que induz à síntese de inibidores de proteases. Esse tipo de defesa é mais importante para a defesa de partes vegetativas das plantas do que para proteção de sementes. As sementes maduras, por se encontrarem em estado de dormência, são incapazes de disparar mecanismos de defesas induzidos pelo ataque de agressores. Desta forma, suas defesas são exclusivamente do tipo constitutivas, isto é, fazem parte do plano de desenvolvimento da planta, sendo depositadas durante a sua formação (Chesin e Zipf, 1990; Xavier-Filho, 1993).

1.2.1- Proteínas tóxicas

Uma grande variedade de proteínas tem sido envolvidas nos mecanismos de resistência contra insetos e patógenos. Algumas dessas pertencem às classes de proteínas cujos mecanismos de ação baseiam-se na modificação das propriedades da matriz extracelular (como as peroxidases; glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, HRGPs e proteínas ricas em glicina, GRPs), nas atividades inibitórias sobre enzimas digestivas de insetos (inibidores de tripsina, cistatinas e inibidores de α -amilases), na capacidade de ligação a quitina e/ou glicoconjugados do trato intestinal de insetos ou parede celular de fungos (vicilinas e lectinas) ou possuem atividades antimicrobianas, como tioninas, quitinases, LTPs e β -1,3 glucanases (Carlini, 2002; Ng, 2004; Shewry e Lucas, 1997; Xavier-Filho, 1993).

Peroxidases

Peroxidases são freqüentemente associadas aos mecanismos de defesa de plantas contra patógenos (Caruso *et al.* 2001; Ye e Ng, 2002). Estas enzimas têm sido muito estudadas em plantas superiores, e suas atividades no processo de resistência podem estar relacionadas com quatro mecanismos diferentes, que ocorrem na matriz extracelular: liberação de peróxido de hidrogênio, síntese de lignina, síntese de suberina e auxílio na construção de ligações intermoleculares durante a organização da parede celular nos sítios de agressão por patógenos (Gomes e Xavier-Filho, 1994). Em *Oryza sativa*, foram observados aumento de atividade e acúmulo de uma peroxidase catiônica após interação com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Reimers *et al.* 1992; Young *et al.* 1995). Aumentos na atividade enzimática de peroxidases após infecção estão também relacionados à síntese de taninos, ao aumento nos níveis de fenóis e quinonas, e à biossíntese de etileno (Reimers *et al.* 1992; Gomes e Xavier-Filho, 1994; Mohammadi e Kazemi, 2002).

Quitinases

Quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações de β -1,4-N-acetilglicosamina presente na quitina. Como a quitina é o principal componente da parede celular de fungos e está ausente em plantas, quitinases desempenham um importante papel na defesa contra estes patógenos. Evidências reforçam que o papel defensivo de quitinases inclui inibição do crescimento fúngico, aumento da resistência a patógenos em plantas que expressam constitutivamente altos níveis de quitinase e quebra de quitina (Benhamou *et al.* 1993; Gijzen *et al.* 2001). A indução de quitinase é freqüentemente coordenada com a expressão de β -1,3-glucanases específicas e outras proteínas PR em resposta ao ataque de patógenos, bem como em resposta ao tratamento com eliciadores e fatores abióticos. Genes de quitinases são diferentemente regulados em resposta ao desenvolvimento ou à colonização de tecidos vegetais por microrganismos (Salzer *et al.* 2000). O uso potencial de quitinases como inseticidas tem sido estudado (Wang *et al.* 1996; Fitches *et al.* 2004). Ding *et al.* (1998) observaram que a sobrevivência e o crescimento de larvas de *Schistocerca gregaria*, crescidas em plantas expressando quitinase em nível de 0,02–0,03% de proteína total, foram significativamente reduzidos. Plantas expressando genes de quitinase podem ter potencial agrônômico para o controle de insetos (Ding *et al.* 1998; Fitches *et al.* 2004). Além disso,

quitinases constitutivas participam da defesa de sementes contra o ataque de insetos (Gomes *et al.* 1996).

11

Em adição à função como reserva protéica, trabalhos confirmam a idéia da participação das vicilinas no mecanismo de defesa de sementes. Vicilinas variantes de sementes de feijão-de-corda (*Phaseolus vulgaris*) são consideradas o principal fator de resistência presente nos genótipos africanos IT81D-1045, IT81D-1032 e Tvu-2027 contra *C. maculatus* (Macedo *et al.* 1993). Trabalhos anteriores mostraram que o grau de digestibilidade de vicilinas 7S, dos cultivares de *Phaseolus vulgaris* resistentes ao ataque de insetos, por proteinases do intestino médio de *C. maculatus*, é menor do que o de vicilina de cultivares susceptíveis (Sales *et al.* 1992). Proteinases do intestino médio de *Sitona ascaus*, bruquídeo que ataca cultivares resistentes e susceptíveis a *C. maculatus*, digeriram bem ambos os tipos de vicilinas.

Sabendo-se que as vicilinas associam-se a matrizes de quitina e a estruturas que contêm quitina no intestino médio de insetos (Sales *et al.* 1996; Firmino *et al.* 1996; Yunes *et al.* 1998), estudos foram realizados para investigar a ação dessas proteínas no crescimento e desenvolvimento de organismos que contenham este polissacarídeo como componente externo de membrana, como é o caso dos fungos, que contêm quitina como parte de sua parede celular (Xavier-Filho e Fernandes, 1998). Gomes *et al.* (1997) mostraram que vicilinas de feijão-de-corda e de outras sementes leguminosas inibem o desenvolvimento de fungos filamentosos.

O mecanismo de ação de vicilinas ainda não é completamente entendido. Propriedades tóxicas de vicilinas parecem estar relacionadas ao seu reconhecimento e interação com glicoproteínas. Mota *et al.* (2003) mostraram que vicilinas de *Phaseolus vulgaris* ligam-se à membrana peritrófica de larvas de *Drosophila saccharalis*. Estudos ainda mais recentes também mostraram a existência de efeito sistêmico destas proteínas (Uchôa *et al.* 2006). Os dados obtidos por este grupo detectaram vicilina em vários órgãos de larvas de *C. maculatus*, após alimentação com vicilinas de *Phaseolus vulgaris*. Estas proteínas foram encontradas na hemolinfa, no intestino médio, no corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi. Além disso, a ligação de vicilinas a microvilosidades, sugere a existência de ligantes específicos.

1.2.2- Participação do tegumento nos mecanismos de defesa

O tegumento tem um papel vital no ciclo de vida das plantas. Antigamente, acreditava-se que o tegumento estivesse associado unicamente à proteção mecânica dos tecidos meristemáticos e de reserva contra choques e abrasões.

Entretanto, hoje, muitas outras funções são atribuídas a essa estrutura, podendo-se citar a capacidade de manter unidas as partes internas da semente; regular a velocidade de trocas gasosas entre a semente e o meio; regular a velocidade de hidratação da semente, diminuindo ou evitando possíveis danos causados pelas pressões desenvolvidas durante a embebição; regular a germinação e servir de barreira (física e/ou química) contra a entrada de microrganismos e insetos (Kozłowski, 1972; Moïse *et al.* 2005).

A participação do tegumento nos mecanismos de defesa das sementes sempre esteve relacionada à sua dureza e principalmente espessura. Entretanto, estudos realizados com *Callosobruchus maculatus* infestando sementes de 73 espécies diferentes, evidenciaram claramente a participação de compostos químicos do tegumento nos mecanismos de resistência dessas sementes (Janzen, 1977). Neste trabalho, foi analisada a relação entre a espessura e dureza do tegumento com a sobrevivência ou morte das larvas desse bruquídeo, nos primeiros estágios do desenvolvimento. Para as sementes de *Vigna* e *Omosia venezuelana*, observou-se uma alta mortalidade das larvas do inseto quando da passagem pelo tegumento, apesar dessas sementes possuírem tegumentos muito finos (Janzen, 1977). Consideráveis variações na mortalidade no primeiro estágio larval de desenvolvimento de *Acanthoscelus* também foram observadas em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Thiery, 1984).

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram a presença de proteínas no tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus munitus*, que apresentaram homologia de seqüência de aminoácidos com vicilinas e foram tóxicas ao bruquídeo *C. maculatus*, quando incorporadas em sementes artificiais (Oliveira *et al.* 1999; Moraes *et al.* 2000; Silva *et al.* 2004).

1.3 – *Glycine max* (soja)

A soja é uma planta herbácea anual, cujo ciclo de vida, desde a germinação até a completa maturação, dura de 75 a 200 dias, dependendo do cultivar, das condições climáticas e do solo (Williams, 1950).

A semente de soja é constituída por um tegumento envolvendo um embrião bem desenvolvido (Figura 3). Este tegumento é muito duro e impermeável. A água entra através de pequenas rachaduras na cutícula (Ma *et al.* 2004). O número de sementes por vagem varia de 1 a 4. Quanto à forma é, em geral, oval, mas varia de acordo com o cultivar, podendo ser globosa, oval ou elipsoidal (Brandão, 1961). A

cor das sementes pode ser amarela, marrom, preta ou verde, apresentando-se uniforme, bicolor ou variegada (Minor *et al.* 1975).

1.3.1- Proteínas do tegumento da semente de soja

As proteínas do tegumento de sementes de soja têm sido investigadas por mais de duas décadas. Neste período, já foram identificadas proteínas como o inibidor de tripsina Kunitz (Kunitz, 1945 apud Gijzen *et al.* 2001); a peroxidase (Gillikin e Graham, 1991); a extensina (Cassab *et al.* 1985), uma proteína rica em glicina (Fukuda *et al.* 1994 apud Sessa e Wolf, 2001) e uma quitinase (Gijzen *et al.* 2001).

Kapoor e Gupta (1978) mostraram a presença de um inibidor de tripsina (TI) em semente de soja e constataram que sua atividade estava presente no tegumento da semente, mas não isolaram nem caracterizaram o composto ativo. Uma glicoproteína de parede celular rica em hidroxiprolina, denominada extensina, foi isolada e imunolocalizada. A extensina acumula-se durante o desenvolvimento da semente de soja e está concentrada principalmente na parede celular das células paliádicas e ampulhetas (Cassab *et al.* 1985; Cassab e Varner, 1987). Sessa e Wolf (2001) isolaram e caracterizaram do tegumento de soja, um inibidor de tripsina e quimotripsina (Bowman-Birk), já bem caracterizado em cotilédones de soja e conhecido por possuir propriedades anticarcinogênicas.

Quatro isoformas de fosfatases ácidas de sementes de soja maduras foram purificadas e caracterizadas, no entanto, a localização não foi determinada (Ferreira *et al.* 1998). As fosfatases ácidas formam um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de uma variedade de ésteres de fosfato em meios ácidos. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, presentes tanto em mamíferos como em plantas e microrganismos (Ferreira *et al.* 1999). Diversos estudos têm mostrado a caracterização de fosfatases ácidas. Em plantas, essas enzimas já foram caracterizadas em raízes (Penheiter *et al.* 1997), tubérculos (Gellatly *et al.* 1994), sementes (Park e Van Etten, 1986; Mallotra e Kayastha, 1990; Ferreira *et al.*, 1998; Granjeiro *et al.* 1999), folhas (Staswick *et al.* 1994), entre outros órgãos (Gabard e Jones, 1990; Rossi *et al.* 1981).

SBP (peroxidase do tegumento de soja) é uma importante enzima encontrada em tegumentos que pertence à classe III de peroxidases vegetais e atua na biossíntese da parede celular, na defesa e em outros processos oxidativos

(Welinder, 1992). Pode também ser importante na lignificação, ou suberização, dureza e permeabilidade. A peroxidase do tegumento de soja é muito estável em alta temperatura, extremos de pH, e em solventes orgânicos. Ao mesmo tempo, é altamente reativa para substratos orgânicos e inorgânicos usando peróxido de hidrogênio (Henriksen *et al.* 2001). SBP tem atraído considerável atenção biotecnológica devido à alta estabilidade e atividade, podendo ser facilmente purificada (Gijzen, 1993; Nissum *et al.* 2001; Kamal e Behere, 2003; Welinder e Larsen, 2004).

Proteínas da superfície do tegumento são responsáveis pela alergenicidade da semente de soja (Gonzalez *et al.* 1995; Gijzen *et al.* 1999). Foi recentemente descoberto que uma proteína hidrofóbica (HPS), sintetizada no endocarpo e, subseqüentemente, depositada na superfície da semente, é a principal proteína alergênica de soja. A hidrofobicidade e a topografia da superfície de variedades de soja expressando altos níveis de HPS podem afetar a fixação e penetração de patógenos, influenciar as propriedades de absorção de água e/ou mediar a fixação do endocarpo para a superfície da semente (Odani *et al.* 1987; Swanson *et al.* 1991; Gonzalez *et al.* 1995; Gijzen *et al.* 1999).

Gijzen *et al.* (2001) isolaram uma quitinase de classe I do tegumento de semente de soja. A quitinase de tegumento é expressa no final do desenvolvimento de sementes, com níveis de expressão mais altos no tegumento. Além disso, sua expressão está associada com senescência, amadurecimento e resposta à infecção patogênica (Gijzen *et al.* 2001).

Recentemente, uma proteína de 24 kDa, denominada SC24, foi purificada de sementes de soja e identificada. Nas sementes maduras, a proteína SC24 encontra-se mais abundante no parênquima e na camada aleurona do tegumento. A expressão de SC24 foi também induzida em tecido vegetativo por infecção pelo patógeno da soja *Phytophthora sojae* e por injúria. A análise de aminoácidos de SC24, revelou uma seqüência N-terminal similar à seqüência parcial relatada para uma globulina 7S básica (Bg) liberada de sementes de soja em água quente, presente nos cotilédones (Hirano *et al.* 1992; Dhaubhadel *et al.* 2005).

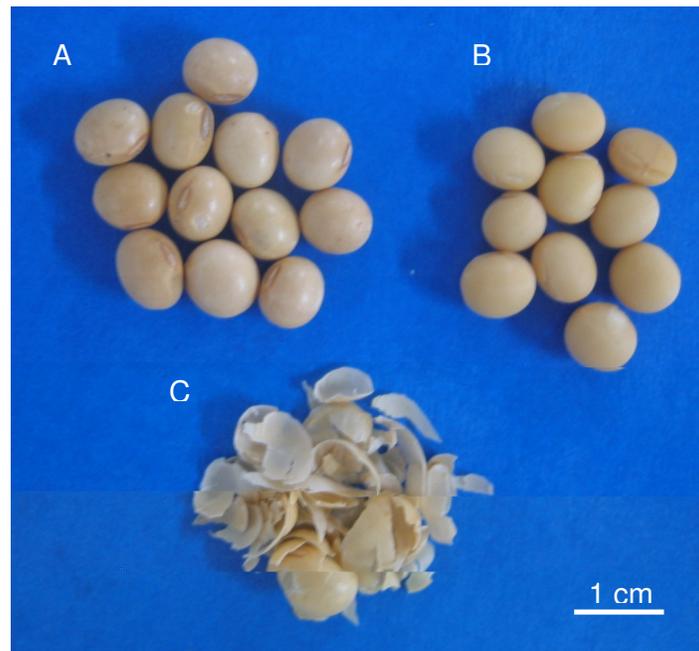


Figura 2 – Sementes de *Guineá max.* A, sementes íntegras; B, sementes sem tegumento; C, tegumento.

1.4– O bruquídeo *Callosobruchus maculatus*

Muitos insetos mastigadores ou sugadores de várias ordens são predadores de leguminosas. Alguns destes insetos se tornaram especializados em predação de sementes, como os carunchos ou gorgulhos da família Bruchidae, da ordem Coleoptera. Dentre estes, o gorgulho *Callosobruchus maculatus*, destaca-se como a principal praga dos grãos armazenados de ~~grão leguminosa~~, popularmente conhecido como feijão-de-corda (Santos et al. 1977).

O adulto de *C. maculatus* apresenta um comprimento de cerca de 2,5 a 3,0 mm; cabeça preta com antenas contendo 11 segmentos ligeiramente serrilhados, tórax preto com pubescências douradas, élitros marrons com manchas pretas. O fêmur é aproximadamente do tamanho da tíbia, porém duas vezes mais grosso, e o fêmur da pata posterior traz um dente agudo e reto (Figura 2). O ovo é branco, de forma sub-elíptica, com comprimento de, aproximadamente, 0,5 mm e largura de 0,3 mm. A larva é de forma curva e cor branca, enquanto a pupa é de cor marrom e nos últimos estágios apresenta vestígios de asas, patas e olhos (Bastos, 1981).

A condição ideal para o desenvolvimento do inseto é temperatura de 32,5 °C e 90% de umidade relativa, sendo o período médio de desenvolvimento de 23 dias. Entre 20 °C e 30 °C e umidade relativa de 60%, a duração dos períodos de oviposição, incubação do ovo, desenvolvimento das larvas e pupas são de 8, 8, 16 e 7 dias, respectivamente. A longevidade do adulto é de 9 a 11 dias (Mookherjee e Chawla, 1964). A postura é realizada um ou dois dias após a emergência e os ovos são postos na parte externa da semente. Os ovos ficam aderidos ao tegumento e, posteriormente, a larva penetra na semente, onde completa seu desenvolvimento. Completado o desenvolvimento, os insetos emergem deixando a semente



Figura 3 – Fêmea de *Callosobruchus maculatus* infestando sementes de *Citrullus max.*

2. OBJETIVOS**2.1 – OBJETIVO GERAL:**

O objetivo desse trabalho é investigar o possível envolvimento do tegumento de sementes de algumas leguminosas nos mecanismos de defesa contra o ataque do inseto *Callosobruchus maculatus* e fungos fitopatogênicos.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar a possível participação dos tegumentos nos mecanismos de defesa das sementes de *Acanthosicyos debilis*, *Acanthosicyos debilis* sp, *Dalmanella*, *Glycyrrhiza max* e *Pisum sativum* (cultivares manteiga, manteiga vermelho e vermelho) contra o ataque de *C. maculatus*;
- Investigar a possível participação de pro (ã)j - 015168 Tc 6.23984 0 Td 0.49584 Tw (o) mecanismos

3. MATERIAL

3.1 – Material biológico

3.1.1- Sementes

- As sementes de *Glycine max*, *Pisum sativum* s. preto, *P. sativum* s. manteiga, *P. sativum* s. vermelho e *P. sativum* s. manteiga vermelho foram obtidas comercialmente no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes.
- As sementes de *Phaseolus vulgaris* (cultivar EPACE-10), *Canavalia ensiformis*, *Dolichos esculentus*, *Azadirachta indica* e *Pavonia* foram obtidas do Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará.
- As sementes de *Abutilon* foram obtidas através de coleta no Campus da UENF.

3.1.2- Insetos

- Os insetos *Callosobruchus maculatus* (gorgulho do feijão-de-corda) foram obtidos a partir de uma colônia mantida desde 1995, no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Esta colônia originou-se de insetos fornecidos pelo professor José Higino Ribeiro dos Santos, da colônia mantida no Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Ceará).
- A colônia é mantida em ambiente com 70% de umidade relativa e 28 °C, em sementes maduras de *Phaseolus vulgaris* da variedade Fradinho, obtidas comercialmente.

3.1.3- Microrganismos

- Os fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium* foram obtidos do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF)/EMBRAPA, Goiânia, Goiás.

3.2 – Reagentes

- Acrilamida – Sigma Co;
- Anticorpo anti-IgG de coelho complexado a esferas de ouro coloidal (10 nm) – Sigma Co;
- Anticorpo anti-IgG de coelho complexado à fosfatase alcalina – Sigma Co;
- Anticorpo anti-IgG de coelho complexado à peroxidase – Sigma Co;
- Anticorpo policlonal anti-quitinase de cotilédones de ~~▲ enanti- e a pavon na~~, produzido em coelho – Gentilmente cedido pela Doutoranda Izabela Silva dos Santos;
- Anticorpo policlonal anti-vicilina de cotilédones de ~~gaa-ung- n.ú.ia cv~~ EPACE-10, produzido em coelho – Gentilmente cedido pela Doutora Adriana Ferreira Uchôa;
- Epon 812 – Polyscience Inc;
- Glutaraldeído grau I – Sigma Chemical Company;
- N-N'metileno bis-acrilamida – Sigma Co;
- p-NPP – Merck;
- Quitinase de cotilédones de ~~▲ enanti- e a pavon na~~ – Gentilmente cedida pela Doutoranda Izabela Silva dos Santos.
- SDS – Merck;
- Unicryl – Polyscience Inc.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau e padrão analíticos e obtidos comercialmente.

4. MÉTODOS

4.1– Ensaios biológicos com sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes naturais

Para verificar a eficácia do tegumento como estrutura de defesa, sementes artificiais com tegumentos naturais foram preparadas com farinha de *guandu* (*unguava*) (cultivar EPACE-10, susceptível ao ataque de *C. maculipes*). A farinha de EPACE-10 (50 mg) foi colocada em um molde cilíndrico e sobre essa massa foi colocado um pedaço de tegumento de semente natural de soja, com a parte externa voltada para baixo. Em seguida, mais 450 mg de farinha de EPACE-10 foram colocados sobre o tegumento. A farinha contendo o pedaço de tegumento foi prensada com o auxílio de uma prensa manual. A semente artificial foi retirada do molde e o excesso de farinha (50 mg) sobre o tegumento foi retirado com o auxílio de um estilete, até que o tegumento ficasse novamente exposto. Sementes controle contendo pedaço do tegumento de EPACE-10 foram preparadas da mesma forma (Figura 4).

As partes da semente que não possuíam tegumento foram protegidas com película Parafilm e fêmeas de 2 dias de idade foram colocadas para ovipositar sobre a parte da semente artificial que continha o pedaço do tegumento. Após um período de 24 h, as sementes foram desinfestadas, o excesso de ovos postos foi removido com o auxílio de uma agulha fina, deixando-se apenas 2 ovos por semente sobre o tegumento. As sementes foram incubadas a 28 °C em estufa incubadora, e após 20 dias, as sementes foram desfeitas para a retirada das larvas, que foram pesadas. A massa e o número de larvas foram comparados com larvas de mesma idade que se desenvolveram nas sementes controle. Os experimentos foram feitos em triplicata (três sementes para cada experimento).

A fim de verificar se esse efeito é exclusivo do tegumento de soja, ou se é uma propriedade natural dos tegumentos de sementes, experimentos semelhantes foram realizados também com tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Dalmanella* e três cultivares de *Phaseolus vulgaris* (feijão comum): manteiga vermelho, vermelho e manteiga.

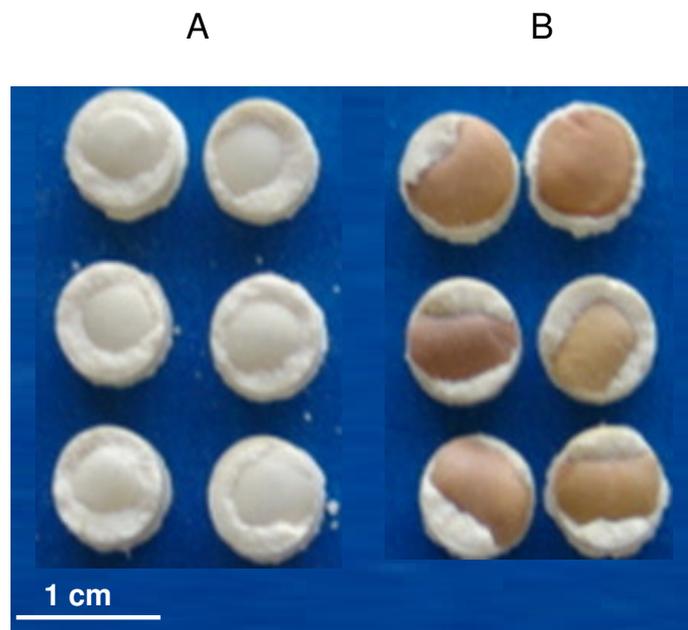


Figura 4 – Sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes naturais de *Canavalia ensiformis* (A) e *gnaunguaria* (B).

4.2– Obtenção das farinhas dos tegumentos das sementes

Tegumentos das sementes de *A. enani* e *a pavonina*, *A. za* sp, *D. a*, *a*, *G. c. n. e. max*, *P. aseos vulga* s (cv manteiga), *P. vulga* s (cv vermelho), *P. vulga* s (cv manteiga vermelho), *P. vulga* s (cv preto) e *Canava* ens m s foram separados do embrião, triturados e peneirados em uma peneira de malha fina (40 mesh), para obtenção das farinhas dos tegumentos.

4.3– Ensaio biológico com sementes artificiais contendo farinha do tegumento de sementes naturais

Ensaio biológico para *C. maculatus* foram feitos utilizando-se um sistema de sementes artificiais. Sementes artificiais, com massa total de 400 mg, foram preparadas com farinha de cotilédones de *gna* (cultivar EPACE-10), contendo concentrações de 0,1 a 16% da farinha do tegumento das seguintes sementes: *A. enani* e *a pavonina*, *A. za* sp, *D. a*, *a*, *G. c. n. e. max*, *P. aseos vulga* s (cv manteiga), *P. vulga* s (cv vermelho), *P. vulga* s (cv manteiga vermelho). Essas sementes foram infestadas com fêmeas de 3 dias de idade por um período de 24 h a 28 °C. Após esse período, as sementes foram desinfestadas, o excesso de ovos postos foi removido com o auxílio de uma agulha fina, deixando-se apenas 3 ovos por semente. Após 20 dias incubadas a 28 °C, as sementes foram desfeitas para a retirada das larvas, que foram contadas e pesadas. A massa e o número de larvas foram comparados com larvas de mesma idade que se desenvolveram em sementes controle (preparadas apenas com farinha de EPACE-10). Os ensaios foram feitos em triplicata, com um total de 6 sementes e 18 ovos por experimento. Os resultados foram expressos em valores de WD_{50} (concentração que diminui 50% a massa das larvas) e LD_{50} (concentração que diminui 50% o número de larvas). Esses valores foram calculados levando-se em consideração a massa e o número de larvas de *C. maculatus* desenvolvidas em sementes artificiais controle (contendo apenas farinha de *gna*).

4.4– Extração de proteínas do tegumento e fracionamento com sulfato de amônio

Para extração das proteínas da farinha do tegumento de sementes de *G. max*, a farinha, na proporção de 1:10 (m/v), foi colocada em tampão fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 500 mM, pH 7,6 (PBS) e deixada por 3 h em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante obtido foi precipitado com sulfato de amônio em concentração entre 0 e 90% de saturação por 16 h a 4 °C, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 30 min, nesta mesma temperatura. O precipitado obtido foi dialisado contra água por 72 h e liofilizado.

4.5– Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose

Uma amostra de 50 mg do precipitado obtido conforme descrito no item 4.4 foi dissolvida em 7 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,6. Esse material foi aplicado em uma coluna de troca iônica em DEAE-Sepharose (13 x 2,0 cm), equilibrada e eluída com o mesmo tampão da dissolução e submetida a um fluxo de 60 mL/h. O material não retido (DI) foi eluído com o tampão de equilíbrio da coluna e o retido foi eluído com cloreto de sódio 0,25 M (DII) e 0,5 M (DIII). Foram coletadas frações de 5,0 mL por tubo e a densidade óptica medida a 280 nm (Espectrofotômetro, Shimadzu UV Mini 1240). Essas frações foram dialisadas contra água por 24 h e liofilizadas.

4.6– Atividade biológica das frações não retida (DI) e retida (DII)

As frações não retida (DI) e retida eluída com cloreto de sódio 0,25 M (DII) obtidas em DEAE-Sepharose foram testadas com relação à sua toxicidade para as larvas de *C. maculipes* através de sistemas de sementes artificiais (Macedo *et al.* 1993). Sementes controle e sementes contendo as concentrações de 0,5; 1 e 2% das frações DI e DII foram feitas e testadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.

4.7– Dosagem de proteínas

Para quantificação de proteínas nas amostras, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se como padrão ovalbumina (Sigma).

4.8– Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras (frações não retida e retidas em DEAE-Sepharose) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, na presença de SDS (Laemmli, 1970).

O gel principal foi montado em placas de vidro de 10 x 13,5 cm, misturando-se: 2,3 mL de água destilada; 5,0 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30%; 2,5 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 100 µL de persulfato de amônio 10% e 4 µL de TEMED. O gel de empacotamento foi preparado misturando-se: 2,1 mL de água destilada; 500 µL da solução acrilamida/bis-acrilamida 30%; 380 µL de tampão Tris 1,0 M pH 6,8; 30 µL de SDS 10%; 30 µL de persulfato de amônio 10% e 3 µL de TEMED. O tampão utilizado na cuba de eletroforese foi o tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%; pH 8,3).

A eletroforese processou-se por aproximadamente 2 h em corrente constante de 15 mA. As amostras contendo 10 µg de proteína foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6,8 contendo glicerol 10%, SDS 10% e azul de bromofenol 1%). O gel foi corado com uma solução de azul brilhante de Coomassie R 0,25% em metanol, ácido acético e água destilada (5:1:1 v/v/v) durante 2 h e foi descorado com uma solução composta por 35% de metanol e 10% de ácido acético.

4.9– Seqüenciamento de aminoácidos

Bandas protéicas obtidas nas análises de eletroforese em géis não corados foram transferidas para uma membrana de polivinil-difluoreto (PVDF). A transferência ocorreu em sistema semi-seco, usando-se tampão Tris 25 mM, metanol 20% e glicina 192 mM, pH 8,0. A membrana de PVDF e pedaços de papel de filtro foram equilibrados nesse mesmo tampão por 20 min. A transferência foi montada usando-se três pedaços de papel de filtro, sobrepostos com a membrana, seguida do gel e outros três pedaços de papel de filtro. O sistema foi fechado e a

transferência processou-se usando uma corrente de 1 mA/cm² do gel durante 4 h. Após a transferência, o pedaço da membrana correspondente à proteína retida em DEAE-Sepharose eluída com NaCl 0,5 M, com massa molecular de aproximadamente 24 kDa, foi recortado, procedendo-se o seqüenciamento automático através de degradação de Edman para determinação da composição em aminoácidos (Seqüenciador automático de proteínas, Shimadzu PPSQ-10).

4.10– Ensaio de atividade fosfatásica em gel

As frações não retida e retidas em DEAE-Sepharose, contendo 10 µg de proteína, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nativo (15%), durante 2 h em corrente constante de 15 mA. Após a corrida, o gel foi lavado com tampão Tris-HCl 150 mM, pH 7,6 e depois disso, incubado no meio de reação contendo este mesmo tampão, cloreto de cálcio 40 mM e *p*-NPP 10 mM (substrato). O gel incubado com essa solução foi mantido na geladeira por 16 h. Após esse período, a reação foi parada adicionando-se 1 mL de hidróxido de sódio 1 M. A reação foi visualizada através da precipitação de fosfato de cálcio sobre a enzima.

4.11– Análise da atividade peroxidásica nas frações do tegumento de soja

As amostras (farinha do tegumento, precipitado 0-90% e as frações não retida e retidas em DEAE-Sepharose) contendo 10 µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, na presença de SDS, durante 2 h em corrente constante de 15 mA, conforme descrito no item 4.8. Foram utilizados c72 aw (m) (Fig. 03

4.12– “Western Blotting”

Com o objetivo de investigar a presença de proteínas do tipo vicilina no tegumento de soja, 10 µg de proteína de amostras de farinha do tegumento de soja, precipitado 0-90% e vicilinas isoladas de cotilédones de ~~gpa-ungu/ta~~ cv EPACE-10 (padrão) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, na presença de SDS, conforme descrito no item 4.8. Em seguida, foram realizados experimentos de “Western blotting”, de acordo com metodologia de Towbin *et al* (1979). As bandas protéicas de géis não corados foram submetidas à transferência para uma membrana de nitrocelulose conforme descrito no item 4.9. Após a transferência, a membrana foi incubada por 2 h à temperatura ambiente em tampão fosfato de sódio 0,1 M, cloreto de sódio 0,5 M, pH 7,6 contendo leite em pó desnatado 2% (tampão bloqueador). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo anti-vicilina de ~~gpa-ungu/ta~~ cv EPACE-10 (1:2000) em tampão bloqueador por 2 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 1 h com PBS e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho complexado com fosfatase alcalina (1:2000), em tampão bloqueador, por 2 h. Passado o período de incubação, a membrana

4.13– Dosagem de vicilina pelo método de ELISA

A extração de proteína das amostras (farinha de tegumento de soja, precipitado 0-90% e frações DI, DII e DIII) foi feita por 1 h em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, a 4 °C. A concentração de proteína extraída foi determinada, e posteriormente a placa de ELISA foi sensibilizada com uma concentração de proteína de 20 µg/100 µL de cada fração, durante a noite a 4 °C. Após esse tempo, a placa foi lavada uma vez com PBS tween 0,05% (300 µL/poço durante 1 h). Em seguida, a cada poço foram adicionados 300 µL de tampão bloqueador (gelatina 1% em PBS tween), deixando-se a placa em repouso por 2 h à temperatura ambiente. Após o tempo de bloqueio, a placa foi novamente lavada com PBS tween 0,05% (300 µL/poço durante 1 h), e a cada poço foram adicionados 50 µL do anticorpo anti-vicilina de ~~gna ung~~ *gna ung* cv EPACE-10 (diluído 1:2000 em tampão bloqueador), durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi novamente lavada com PBS tween, por três vezes, 5 min cada, e em seguida foi incubada com o anticorpo anti-IgG de coelho complexado à fosfatase alcalina (diluído 1:2000 em 50 µL de PBS tween bloqueador), por 45 min à temperatura ambiente. A placa foi lavada com PBS tween, três vezes, 5 min cada. Foram feitos dois tipos de controle para cada amostra: amostra incubada sem anticorpo e amostra incubada somente com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho complexado à fosfatase alcalina). A revelação foi realizada com uso de *p*-NPP (5 mg de *p*-NPP para 5 mL de tampão glicina 0,1 M; cloreto de magnésio 1 mM e cloreto de zinco 1 mM, pH 10,2). Foram aplicados a cada poço da placa, 50 µL da solução de revelação e a reação foi parada com 50 µL de hidróxido de sódio 3 N, na menor presença de luz. A leitura foi realizada a 405 nm. Para os cálculos da concentração, foi utilizada uma curva-padrão de vicilina de cotilédones de ~~ungu~~ *ungu* (cv EPACE 10).

4.14– Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100

A fração retida obtida na cromatografia de troca iônica (DIII) foi submetida à cromatografia de exclusão molecular. Uma amostra de 50 mg da fração foi dissolvida em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,6. Esse material foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular em Sephacryl S-100 (58 x 1,0 cm),

equilibrada e eluída com o mesmo tampão da dissolução e submetida a um fluxo de 30 mL/h. Foram coletadas frações de 1,0 mL e a densidade óptica medida a 280 nm. Estas frações foram dialisadas contra água por 24 h e liofilizadas.

4.15– Atividade biológica das frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100

As frações S-1, S-2, S-3 e S-4 obtidas em Sephacryl S-100 foram testadas em sua toxicidade para as larvas de *C. maculatus* através de sistemas de sementes artificiais (Macedo *et al.* 1993). Sementes artificiais controle e sementes contendo a concentração de 1% das frações S-1, S-2, S-3 e S-4 foram feitas e testadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.

4.16– Dosagem de quitinase pelo método de ELISA

Foram realizadas dosagens de quitinase nas amostras: precipitado, DII, S-1, S-2, S-3, S-4 e na farinha de tegumento das sementes *C. ensifera*, *A. pavonina*, *D. albissima*, *A. zasp.*, *unguiculata*, *G. max*, *P. vulgata* (cv manteiga), *P. vulgata* (cv vermelho) e *P. vulgata* (cv preto). O primeiro anticorpo utilizado foi o anticorpo policlonal anti-quitinase de *A. enantia pavonina*, produzido em coelho (diluído 1:1000 em PBS tween bloqueador). Para os cálculos da concentração, foi utilizada uma curva-padrão de quitinase. Todos os demais procedimentos foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 4.13.

4.17– Determinação da atividade peroxidásica

O ensaio de atividade peroxidásica foi feito segundo metodologia descrita por Hammerschmidt *et al.* (1982). A extração de proteínas das amostras (DII, S-1, S-2, S-3, S-4) foi feita em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0. A reação constituiu-se da mistura de 8,5 µL da amostra e posterior adição de 1 mL do meio contendo 0,25% de guaiacol em peróxido de hidrogênio 10 mM e fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Para que a reação ocorresse e a atividade peroxidásica fosse medida, as amostras foram deixadas por 10 min em temperatura ambiente e, em seguida a leitura de absorbância foi feita a 470 nm. Para os cálculos da atividade peroxidásica foi utilizada uma curva-padrão de concentrações crescentes de peroxidase (Sigma).

Uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade de enzima que catalisa um aumento de absorvância de 0,01 por minuto a 470 nm.

4.18– Determinação da atividade inibitória de tripsina

Os experimentos de atividade inibitória de tripsina foram realizados segundo a metodologia descrita por Xavier-Filho e Coelho (1980), usando BAPNA (N-benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida) como substrato. As amostras DI (5 mg), DII (6 mg) e DIII (15 mg) foram extraídas em 1 mL de Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8,2 por 30 min em temperatura ambiente. Uma amostra de 50 µL do extrato foi misturada ao meio contendo tripsina (20 µg/100 mL) em Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM pH 8,2 a 37 °C por 5 min. Em seguida, foi adicionado o substrato BAPNA em DMSO (dimetil sulfóxido) 1%, usado em uma concentração final de 1 mM, em um volume final de 1,5 mL. Após 15 min de incubação a 37 °C, a reação foi parada pela adição de 1 mL de ácido acético 30%. A absorvância foi lida a 410 nm. A atividade foi interpretada como o aumento de 0,01 unidade de absorvância a 410 nm. Para os cálculos finais de atividade trípica nas amostras, foi utilizada uma curva-padrão preparada com tripsina. A atividade inibitória foi determinada medindo-se a atividade trípica com o substrato BAPNA, após pré-incubação com o inibidor.

4.19– Localização de quitinase nas larvas de *C. maculatus*

4.19.1- Preparação do material de rotina para microscopia de luz

As larvas de *C. maculatus*, crescidas em sementes artificiais controle, foram submetidas à perfuração de sua cutícula, para uma melhor fixação em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,0, durante 120 min. Depois de fixados, os tecidos foram lavados 6 vezes com o tampão cacodilato 50 mM, pH 7,0 em temperatura ambiente. O tempo entre as lavagens foi de 20 min.

A pós-fixação foi realizada durante 60 min no escuro, usando tetróxido de ósmio 2% em água destilada e ferricianeto de potássio 1,6% e cloreto de cálcio 10 mM em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,0, na proporção de 1:1 (v/v).

Em seguida, o material foi lavado com tampão cacodilato 50 mM, pH 7,0, 4 vezes durante 20 min. A etapa de desidratação foi realizada em série crescente de

acetona: 50%, 70%, 90% e 100% por 30 min cada etapa, em temperatura ambiente, sendo a última etapa repetida por 3 vezes. O material foi infiltrado em resina Epon e acetona 100%, nas seguintes proporções: 1:3; 1:2; 1:1; 2:1; 3:1; resina pura por 8 h. As larvas foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1mL contendo a resina, onde permaneceram por 48 h a 70 °C para que ocorresse a polimerização. Os blocos polimerizados em Epon foram desbastados em Piramitome LKB. Cortes semifinos de cerca de 1 µm foram realizados utilizando-se navalha de vidro. Estes cortes foram corados com azul de toluidina e examinados ao microscópio de luz convencional (Microscópio Zeiss, MC 100 SPOT).

4.19.2- Preparação do material para imunohistoquímica em resina Unicryl

As larvas de *C. maculatus*, crescidas em sementes artificiais contendo 1% da fração S-3 (obtida em Sephacryl S-100) e larvas controle, foram submetidas à perfuração de sua cutícula, na porção anterior, média e posterior do corpo para permitir a infiltração dos agentes fixadores: glutaraldeído grau I 0,01 M, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato 50 M, pH 7,0 por um período de 2 h em temperatura ambiente. Após este tempo, o material foi lavado 4 vezes em tampão cacodilato ,

ção

lavados levemente com PBS (fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,5 M; pH 7,3) e bloqueados com PBS contendo 1% de BSA por 2 h. Os cortes foram incubados com o primeiro anticorpo (anti-quitinase de *A. nidulans* e *A. niger*) na diluição de 1:500 por 4 h. Foram lavados com PBS duas vezes, sendo o intervalo entre as lavagens de 30 min. Nesta etapa, os cortes foram incubados com o segundo anticorpo complexado com partículas de ouro coloidal (10 nm) na diluição de 1:100 (anti-IgG de coelho) por 2 h. Os controles foram feitos incubando-se os cortes apenas com o segundo anticorpo. Após este processo, os cortes foram lavados com PBS. Os cortes foram revelados por precipitação com prata (inibidor + estimulador - Kit Amersham) na proporção de 1:1 (v/v), por 10 min, lavados com água destilada e em seguida observados por microscopia óptica.

4.20– Atividade biológica de frações protéicas sobre fungos fitopatogênicos

A avaliação da toxicidade das frações obtidas em DEAE-Sephrose (DI, DII e DIII) sobre o crescimento dos fungos *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger* foi feita através de ensaios de inibição de crescimento em meio líquido. Esporos ($1,0 \times 10^4$ /mL) foram incubados em 200 μ L de meio de cultura (caldo Sabouraud), contendo 400 μ g/mL de proteína das diferentes frações cromatográficas preparadas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células em temperatura de 28 °C por um período de 60 h, e a determinação da densidade óptica (reflexo do crescimento micelar) foi feita a cada 6 h em um leitor de microplacas a 620 nm. Foram feitas 3 repetições para cada amostra e os controles foram feitos nas mesmas condições, mas sem adição de proteína.

Todo o procedimento do ensaio foi feito sob condições assépticas em cabine de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

5. RESULTADOS

5.1– Ensaio biológico de sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes naturais.

A Figura 5 mostra a interferência dos tegumentos de sementes sobre o desenvolvimento das larvas de *C. maculipes*, crescidas em sementes artificiais cobertas com tegumento natural de *Glycine max*, *Abutilon* sp, *D. oleifera*, *Canavalia ensiformis* e *Phaseolus vulgaris* (cultivares manteiga vermelho, vermelho e manteiga).

As larvas postas sobre sementes cobertas com tegumento de sementes de *Abutilon* sp não eclodiram, porém, os tegumentos apresentaram perfurações superficiais e os ovos encontravam-se furados, indicando que as larvas saíram dos ovos na direção inversa ao tegumento (Figura 5).

As sementes cobertas com tegumento de *Canavalia ensiformis* apresentaram uma percentagem de larvas mortas nos ovos de cerca de 75%. Nas sementes de *D. oleifera* não houve eclosão de larvas (Figura 5). Entre as larvas postas em sementes cobertas com tegumento de *Phaseolus vulgaris* o tegumento do cultivar manteiga vermelho, promoveu uma diminuição da eclosão larval de 68,5%, enquanto a eclosão larval no tegumento de *Phaseolus vulgaris* vermelho e manteiga diminuiu 37,5% e 25%, respectivamente. As larvas postas sobre as sementes cobertas com o tegumento do feijão comum (cv manteiga vermelho) também apresentaram mortalidade de cerca de 70% antes de atravessarem o tegumento (Figura 5).

Os ensaios feitos com sementes artificiais cobertas com tegumento de soja mostraram resultados diferentes. Do total de larvas que eclodiram nas sementes de *Glycine max*, 93% sobreviveram e encontravam-se nas sementes após 20 dias. Os dados mostram que não houve variações significativas entre o número de larvas crescidas nas sementes

sobrevivência das larvas, embora com massas bem menores que as larvas crescidas nas sementes controle. Devido a isso, o tegumento das sementes de soja foi o escolhido para a investigação da toxicidade, visto que embora haja toxicidade também é possível à obtenção das larvas para os experimentos futuros.

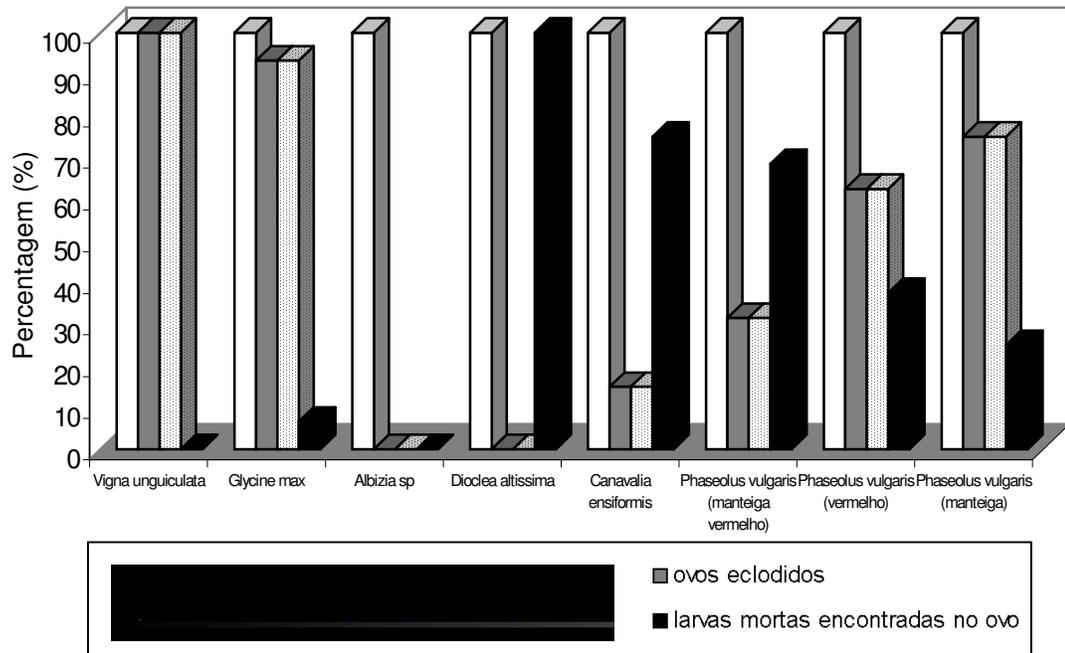


Figura 5 – Experimentos de sementes artificiais cobertas com tegumento natural das sementes de *Vigna unguiculata* cv EPACE-10 (controle), *Glycine max*, *Albizia sp*, *Dioclea altissima*, *Canavalia ensiformis* e *Phaseolus vulgaris* (cultivares manteiga vermelho, vermelho e manteiga). Os experimentos foram feitos em triplicatas (3 sementes para cada experimento) e foram deixados 2 ovos por semente (total de 18 ovos). As sementes foram incubadas por 20 dias.

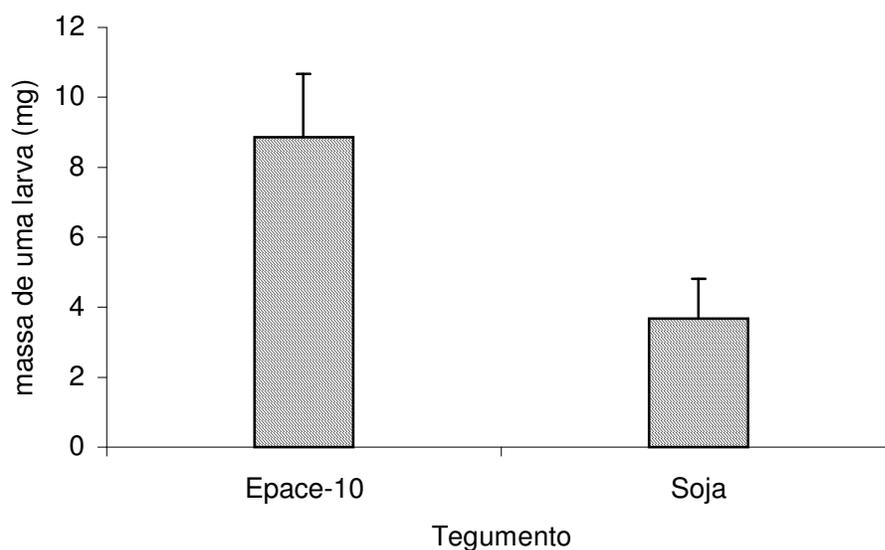


Figura 6 – Massa das larvas de *Callosobruchus maculatus* desenvolvidas nos experimentos de sementes artificiais cobertas com tegumento natural de *unguicula* (cv EPACE-10) e *Glycine max*. As sementes foram incubadas por 20 dias e os dados representam a média das 3 repetições.

5.2– Ensaio biológico de sementes artificiais contendo farinha de tegumento de sementes naturais

Sementes artificiais contendo concentrações crescentes das farinhas dos tegumentos das sementes de *Glycine max*, *Abutilon* sp., *Datura stramonium*, *A. pavanum* e *Phaseolus vulgaris* (cultivares manteiga vermelho, vermelho e manteiga) foram confeccionadas com o intuito de determinar-se os valores de WD_{50} e LD_{50} .

Os três cultivares de *Phaseolus vulgaris* testados foram tóxicos para o desenvolvimento das larvas de *C. maculipes* e levando-se em consideração os valores de WD_{50} e LD_{50} , o tegumento das sementes do cultivar manteiga foi o mais tóxico, pois em concentração de 4% foi capaz de reduzir o número (LD_{50}) e a massa das larvas (WD_{50}) do inseto em 50%. O cultivar manteiga vermelho apresentou valores de WD_{50} e LD_{50} de 4 e 12% respectivamente, enquanto para o tegumento do cultivar vermelho esses valores foram de 3 e 15% respectivamente (Figura 7A e 7B). Com relação à toxicidade da farinha do tegumento de soja, a WD_{50} foi de 8,8% e a LD_{50} de 12,4%. Para a farinha do tegumento de *A. pavanum* foi encontrado o valor de 9% tanto para WD_{50} como para LD_{50} (Figura 7A e 7B). Os valores de WD_{50} e LD_{50} para *Datura stramonium* foram de 4 e 2%, respectivamente (Figura 7A e 7B). De todos os tegumentos analisados, o tegumento de *Abutilon* sp. mostrou-se o mais tóxico para as larvas, sendo os valores de WD_{50} e LD_{50} de 0,3 e 1%, respectivamente (Figura 7A e 7B). Em concentração de 2% foi observada uma mortalidade de 100% das larvas (dados não mostrados). Esses resultados embora mostrem números bastante diferentes para WD_{50} e LD_{50} para os diferentes tegumentos, todos podem ser considerados muito tóxicos, visto que durante a eclosão através do tegumento a larva entra em contato com uma concentração de 100% do tegumento.

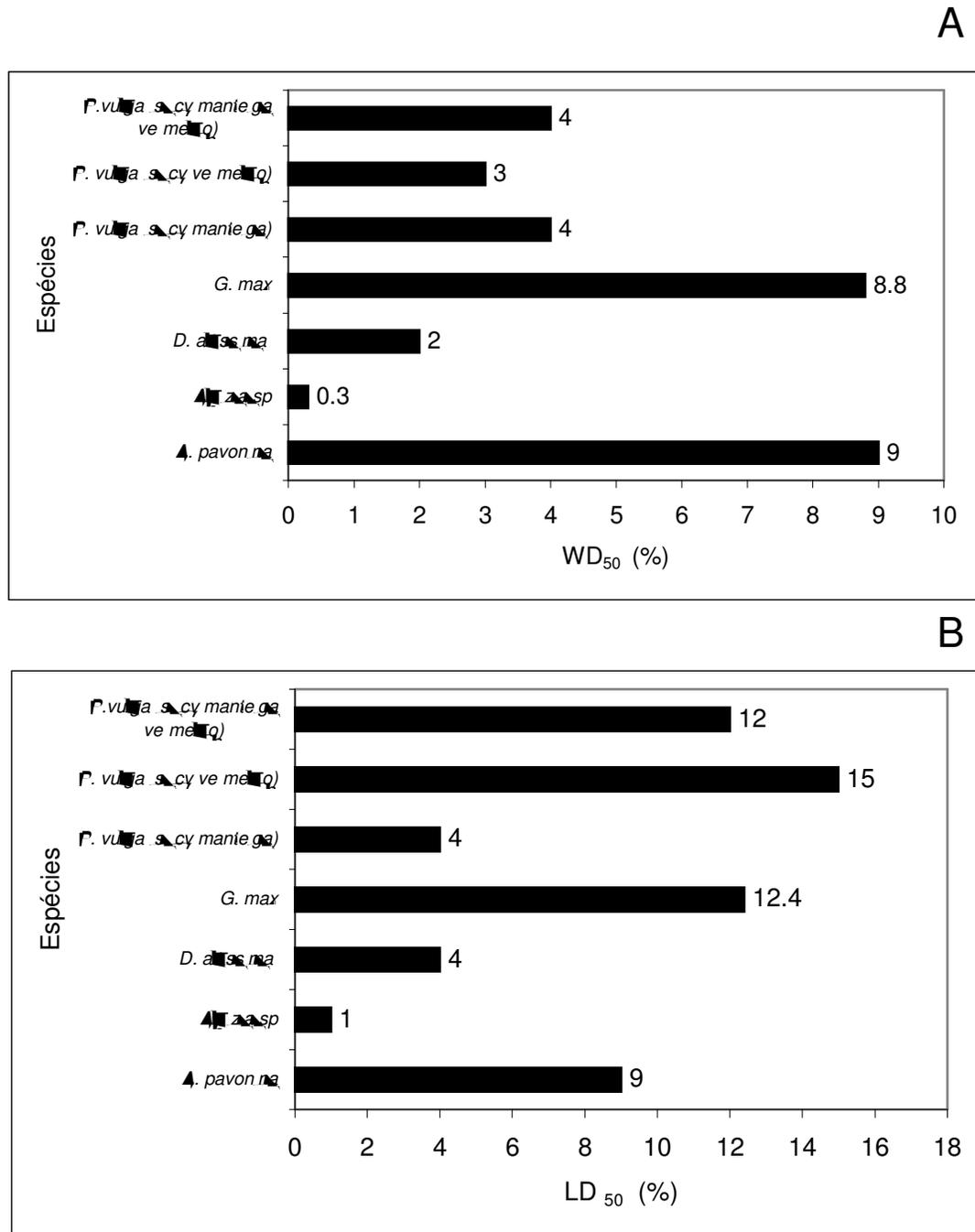


Figura 7 – (A) Valores de WD₅₀ (concentração que diminui em 50% a massa das larvas) e (B) Valores de LD₅₀ (concentração que diminui em 50% o número de larvas) para os tegumentos das sementes de *G. max*, *A. za* sp, *D. adissina*, *A. pavonina* e *P. vulgaris* (cultivares manteiga vermelho, vermelho e manteiga).

5.3– Perfil cromatografico da fração precipitada 0-90% do tegumento de soja em coluna de troca iônica em DEAE-Sepharose

No perfil cromatográfico do precipitado 0-90% em cromatografia em DEAE-Sepharose, observou-se a presença de um pico de absorvência em 280 nm que não ficou retido na matriz (DI) e duas frações protéicas que ficaram retidas na coluna e foram eluídas com cloreto de sódio 0,25 M (DII) e 0,5 M (DIII), mostrando a presença de proteínas ácidas no tegumento das sementes de soja (Figura 8). Essas frações foram dialisadas contra água por 24 h e liofilizadas. Essa cromatografia foi repetida inúmeras vezes para acumular este material para os ensaios de eletroforese, atividade contra *C. maculatus*, entre outros.

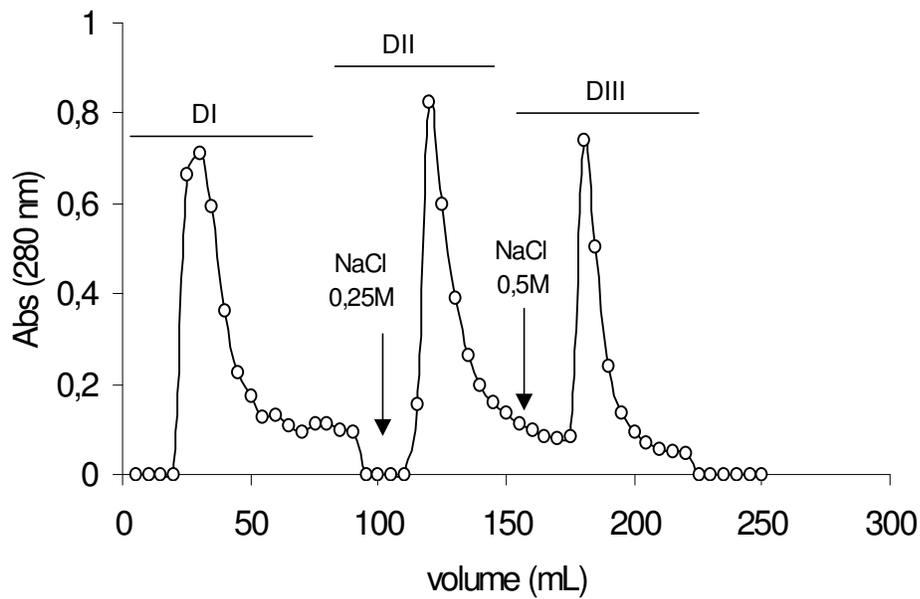


Figura 8 – Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose da fração precipitada 0-90% com sulfato de amônio do tegumento de soja. A coluna foi equilibrada e o material não retido foi eluído com o tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,6 e os picos retidos foram eluídos com cloreto de sódio de 0,25 e 0,5 M. Foram coletados 5 mL por tubo sob o fluxo de 60 mL/h.

5.4– Toxicidade das frações não retida (DI) e retida (DII) obtidas na cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose para *C. maculatus*

A fração não retida em DEAE-Sepharose (DI) teve sua atividade tóxica testada para as larvas de *Callosobruchus maculatus* através de um sistema de sementes artificiais contendo concentrações de 0,5; 1 e 2% (Figura 9A). Pode-se observar que essa fração apresentou toxicidade significativa para as larvas do inseto, visto que houve uma redução de 46,16% na massa das larvas crescidas em sementes contendo 2% dessa fração, comparando-se com as larvas que se desenvolveram em sementes controle (Figura 9A).

A Figura 9B mostra os resultados obtidos com o sistema de sementes artificiais contendo a fração retida em DEAE-Sepharose, eluída em NaCl 0,25 M (DII), nas mesmas concentrações testadas para fração DI. Observa-se que a fração se mostrou tóxica na menor concentração testada (0,5%), sendo que em concentração de 2%, o material foi capaz de reduzir cerca de 87% da massa das larvas do inseto de 20 dias de idade. O valor de WD_{50} da fração DII foi estimado em 1,14%. Não foi possível testar a atividade tóxica da fração DIII por falta de material suficiente.

5.5– Caracterização das proteínas presentes no tegumento de soja

As frações obtidas na cromatografia de troca iônica do precipitado 0-90% foram visualizadas através de eletroforese em gel de poli(acrilamida) 15% na presença de SDS. Na Figura 10A, observa-se que no pico não retido em DEAE-Sepharose (DI) predominam bandas protéicas de massas moleculares de aproximadamente 43 e 36 kDa. Na raia 4 (fração DII), pode-se observar o predomínio de bandas que possuem massas com cerca de 45, 25 e 23 kDa. Na fração DIII há o predomínio de bandas protéicas que possuem massas moleculares de aproximadamente 27, 24, 19 e 15 kDa.

A presença de bandas protéicas com atividade peroxidásica foi também investigada (Figura 10B). Observou-se a presença de atividade peroxidásica em todas as frações testadas, com exceção da fração não retida em DEAE-Sepharose (Figura 10B). Essa atividade foi observada em bandas protéicas com massas moleculares próximas a 45 kDa, sendo melhor visualizada no precipitado e na fração

eluída da DEAE-Sepharose com NaCl 0,25 M (DII).

Também foi possível observar no ensaio para fosfatase em gel nativo (Figura 10C), que esta atividade está presente nas três frações obtidas na DEAE-Sepharose. Entretanto, a maior atividade fosfatásica foi observada na fração DII (retida em DEAE, eluída com cloreto de sódio 0,25 M).

A presença de quitinase nas frações da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose foi analisada através de “Western blotting” utilizando-se anticorpo anti-quitinase de *A. enanti e a pavon na*. A presença de duas bandas com reação imunológica positiva na fração DII confirma a presença de proteínas do tipo quitinase nesta fração (Figura 10D). As outras frações obtidas na cromatografia em DEAE-Sepharose não apresentaram reação imunológica com o anticorpo anti-quitinase (dados não mostrados).

A banda protéica de 24 kDa presente na fração DIII foi submetida a seqüenciamento aminoterminal, mostrando uma seqüência parcial 85% homóloga à fosfatase ácida de *S. nec. sp* (Figura 10E).

5.6– Detecção de vicilinas nas frações do tegumento de *G. max*

Observou-se através de “Western blotting” utilizando-se anticorpo anti-vicilina de *gn2* cv EPACE-10, a presença de bandas protéicas que reagiram com o anticorpo, indicando a presença de proteínas do tipo vicilina tanto na farinha do tegumento quanto na fração precipitada com sulfato de amônia (Figura 11).

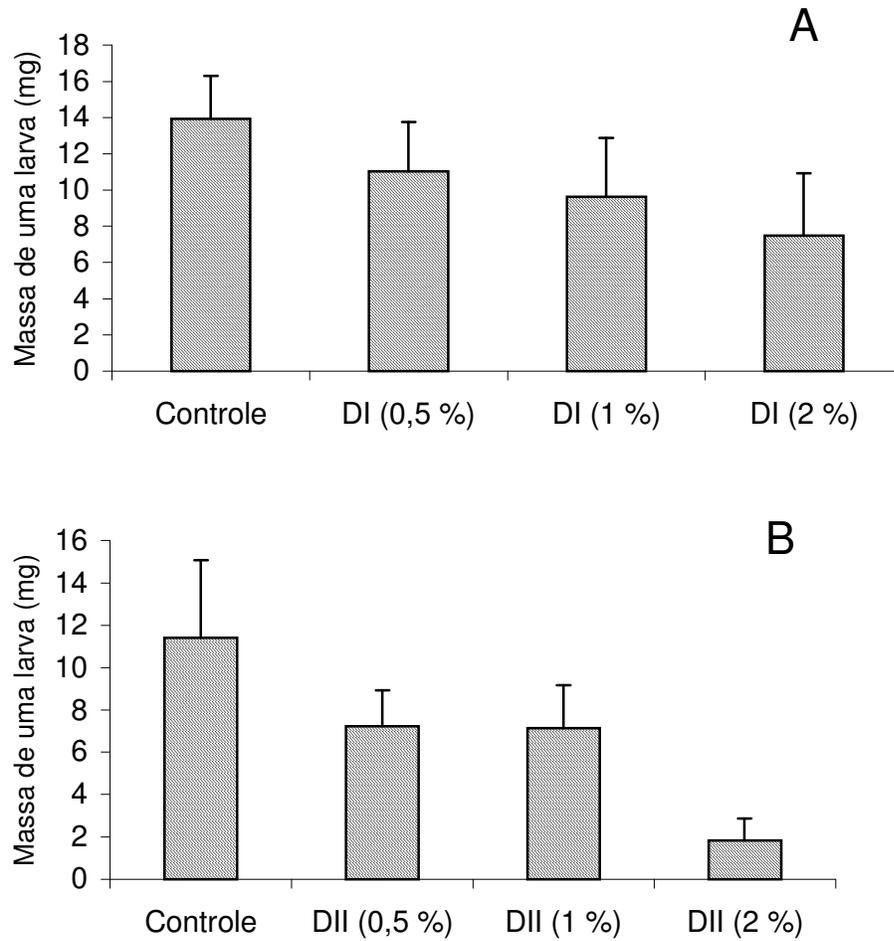
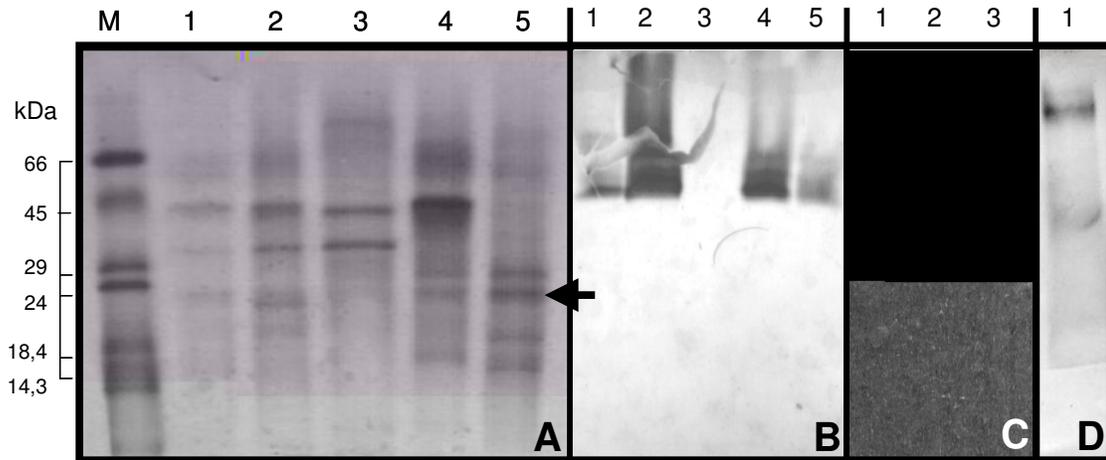


Figura 9 – Atividade biológica das frações não retida (A) e retida em DEAE-Sepharose eluída com NaCl 0,25 M (B). As sementes artificiais continham concentrações de 0,5; 1 e 2% das frações. As sementes foram incubadas por 20 dias e os resultados representam uma média de 3 repetições.



2	F	V	L	T	N	Q	D	8	Proteína de 24 kDa da fração DIII
3	F	L	L	T	N	D	D	9	Fosfatase ácida de <i>S. necopolis</i> E

Figura 10 – (A) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% das proteínas presentes no tegumento de soja. M- marcador de massa molecular (66 kDa – BSA; 45 kDa – ovalbumina; 29 kDa – anidrase carbônica; 24 kDa – tripsinogênio; 18,4 kDa – β -lactoglobulina; 14,3 kDa – lisozima), 1- farinha do tegumento, 2- precipitado 0-90%, 3- fração DI, 4- fração DII e 5- fração DIII. (B) Atividade peroxidásica em membrana de nitrocelulose de proteínas separadas em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS. 1- farinha do tegumento, 2- precipitado 0-90%, 3- fração DI, 4- fração DII e 5- fração DIII. (C) Atividade fosfatásica em gel de poliacrilamida nativo 15%. 1: fração DI, 2: fração DII e 3: fração DIII. (D) Detecção de quitinase na fração DII através de “Western blotting”. (E) Seqüência parcial de aminoácidos da proteína de 24 kDa da fração DIII. A seta indica a banda protéica submetida a seqüenciamento de aminoácidos.

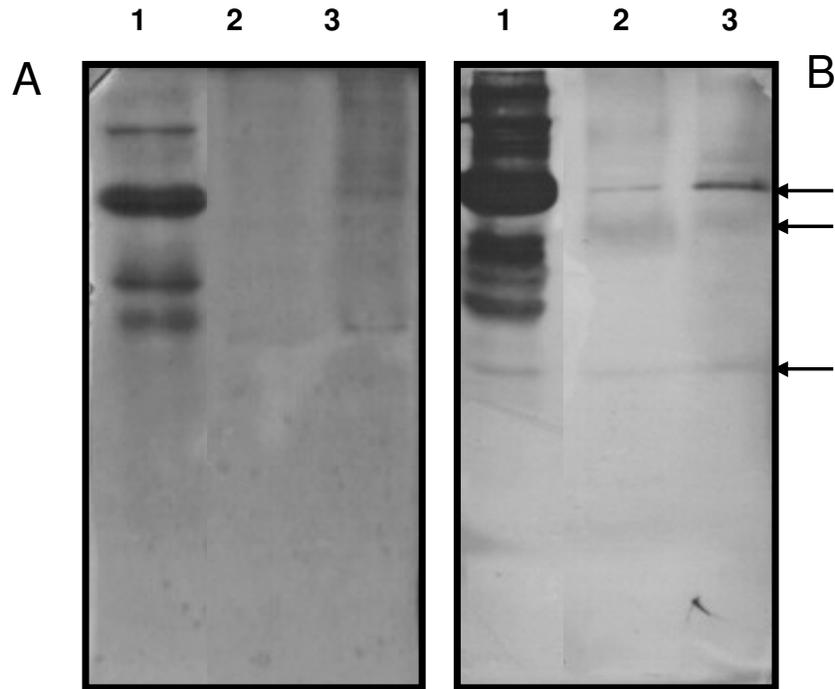


Figura 11 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS (A) e detecção de vicilina por “Western blotting” (B) na farinha do tegumento de soja e na fração precipitada com sulfato de amônio (0-90% de saturação). Foram aplicados 50 μ L (10 μ g de proteína) em cada poço. 1: Vicilina de ~~992 μ g~~ cv EPACE-10 (padrão), 2: Farinha do tegumento e 3: Precipitado 0-90%. As setas indicam as bandas imunorreativas.

5.7– Dosagem de vicilina pelo método de ELISA

Através de experimentos de ELISA, utilizando-se anticorpo anti-vicilina de ~~922-1001~~ cv EPACE-10, observou-se a presença de proteínas imunorreativas em todas as frações testadas. A Figura 12 mostra as concentrações de vicilina encontradas na farinha do tegumento, precipitado 0-90% e frações da DEAE-Sepharose. Essas proteínas equivalem a 0,59% (ou 5,9 ng/μg) do total de proteínas (Figura 12A) e representam cerca de 0,005% da massa seca total da farinha do tegumento (Figura 12B). Na fração precipitada 0-90% a concentração de vicilina por proteína foi de 3,74 ng/μg. Com relação a quantidade de vicilina por peso seco da fração foi encontrado um valor de 0,08%. Com relação à concentração de vicilina encontrada nas frações da DEAE-Sepharose, observou-se que a fração DII concentra a maior parte dessas proteínas, perfazendo 0,16% do peso seco da fração e uma concentração dentro do pool de proteínas equivalente a 41 ng de vicilina por μg de proteína (Figuras 12A e 12B). A menor percentagem (0,028%) foi detectada na fração DIII (Figura 12B).

5.8– Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 da fração DII.

No perfil cromatográfico da fração retida eluída com NaCl 0,25 M, em cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100, observou-se a presença de 4 picos denominados: S-1, S-2, S-3 e S-4 (Figura 13). Essas frações foram dialisadas contra água por 24 h e liofilizadas. Essa cromatografia foi repetida inúmeras vezes para acumular este material para os testes de atividade biológica contra *C. maculatus* e atividades protéicas.

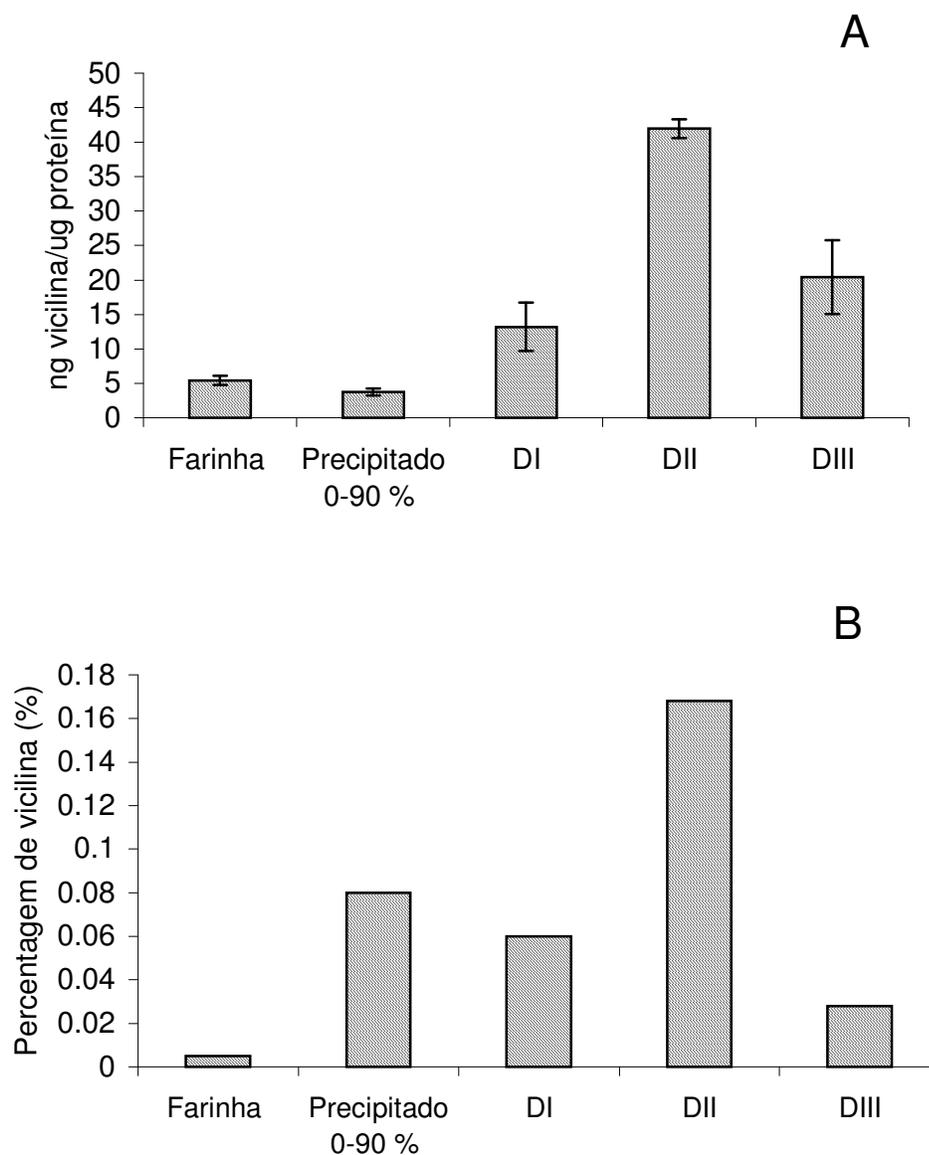


Figura 12 – Dosagem de vicilina na farinha do tegumento, precipitado 0-90% e frações da DEAE-Sepharose. Resultados expressos em concentração de vicilina (ng) por μg proteína (A) e porcentagem de vicilina nas frações (B). Os ensaios foram realizados através de experimentos de ELISA, utilizando-se anticorpos anti-vicilina de ~~gpa-10~~ cv EPACE-10. As colunas representam a média de 2 repetições e as barras (A), o desvio padrão.

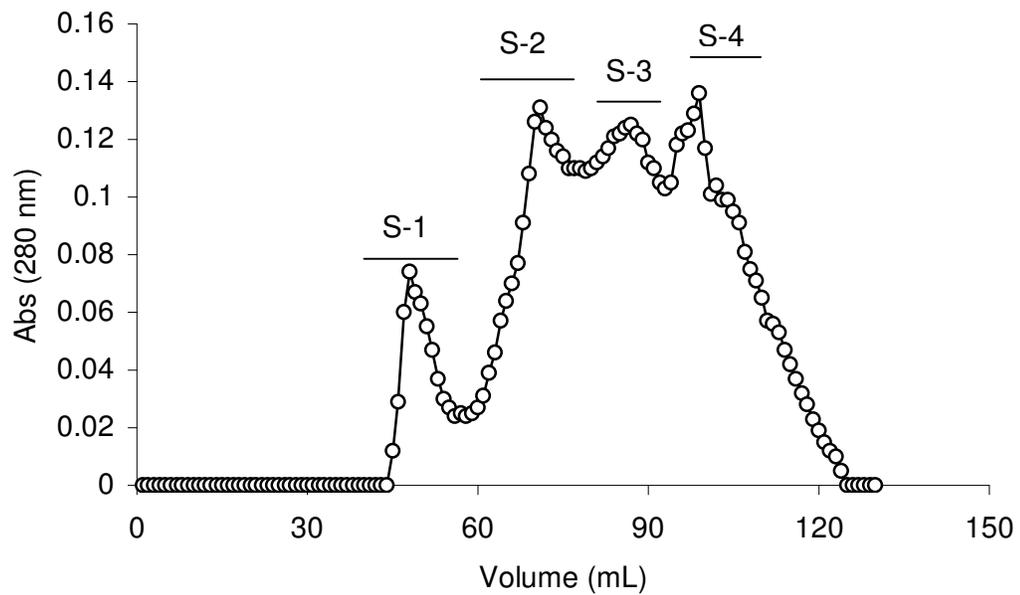


Figura 13 – Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 da fração DII obtida em DEAE-Sepharose. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,6 e o material foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio da coluna. Foram coletadas frações contendo 1 mL por tubo sob o fluxo de 30 mL/h e a absorbância lida a 280 nm.

5.9– Toxicidade das frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 para *C. maculatus*

As frações S-1, S-2, S-3 e S-4, obtidas em Sephacryl S-100, tiveram sua atividade biológica testada para *Callosobruchus maculatus* através de um sistema de sementes artificiais em concentração de 1%. As frações S-1 e S-3 apresentaram as toxicidades mais acentuadas. A fração S-1, na concentração testada, foi capaz de reduzir a massa das larvas em 47%. Com relação ao número de larvas, houve uma diminuição em cerca de 60%. Pode-se observar, no entanto, que as frações S-2 e S-4 não apresentaram toxicidade para as larvas do inseto, pois estas frações não promoveram reduções na massa e nem no número de larvas, comparando-se com as larvas que se desenvolveram em sementes controle. Esses resultados são apresentados na Figura 14.

5.10– Dosagem de quitinase pelo método de ELISA

Através de experimentos de ELISA, utilizando-se anticorpo anti-quitinase de *A. gossypii* e *A. pavanella*, observou-se a presença de proteínas imunorreativas nas frações do tegumento de soja (Figura 15) e no tegumento de algumas outras sementes estudadas (Figura 16). Pode-se observar que a fração DII é a fração mais rica em quitinase, possuindo 0,2 µg desta proteína por mg de pó. Dentre as frações obtidas em Sephacryl S-100, a fração S-2 possui a maior quantidade de quitinase por quantidade de pó: 0,143 µg/mg (Figura 15).

Com relação ao tegumento das sementes, quitinase representa aproximadamente 9,5 ng/mg de tegumento de *A. pavanella*. O tegumento das sementes *G. max* e *P. vulgaris* vermelho apresentaram quantidades de quitinase similares entre elas (cerca de 22 ng/mg). Apenas o tegumento de sementes de *A. gossypii* não apresentou proteínas imunorreativas com o anticorpo de *A. pavanella* e os tegumentos de *C. ensiformis*, *unguiculata* cv EPACE-10, *D. aduncata* e os cultivares de *P. vulgaris* manteiga e preto apresentaram menos de 7 ng de quitinase por mg de pó (Figura 16).

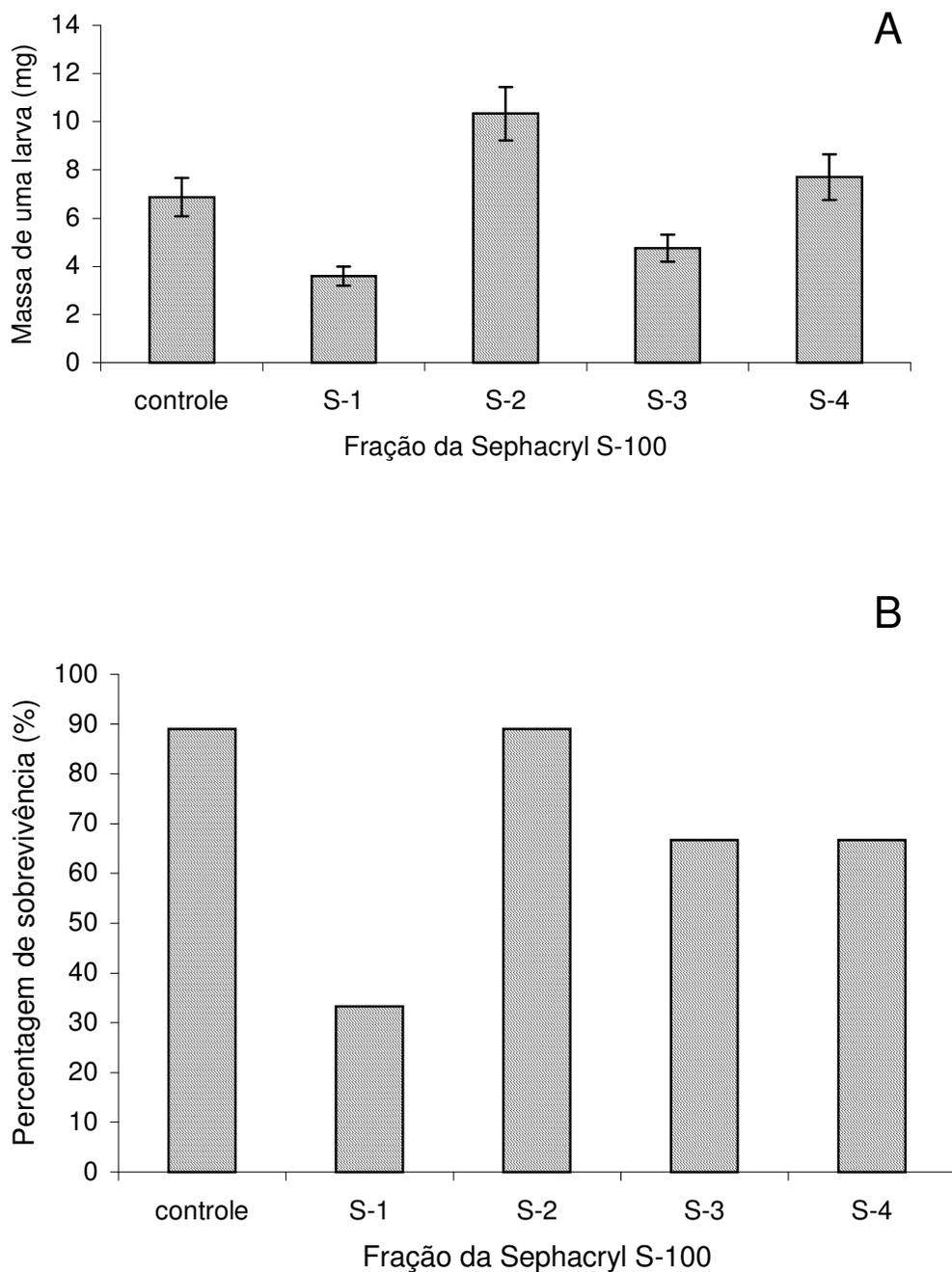


Figura 14 – Atividade biológica das frações obtidas em Sephacryl S-100. Massa de uma larva (A) e Percentagem de sobrevivência das larvas (B). As sementes artificiais continham 1% das frações. As sementes foram incubadas por 20 dias e os resultados representam uma média de 3 repetições.

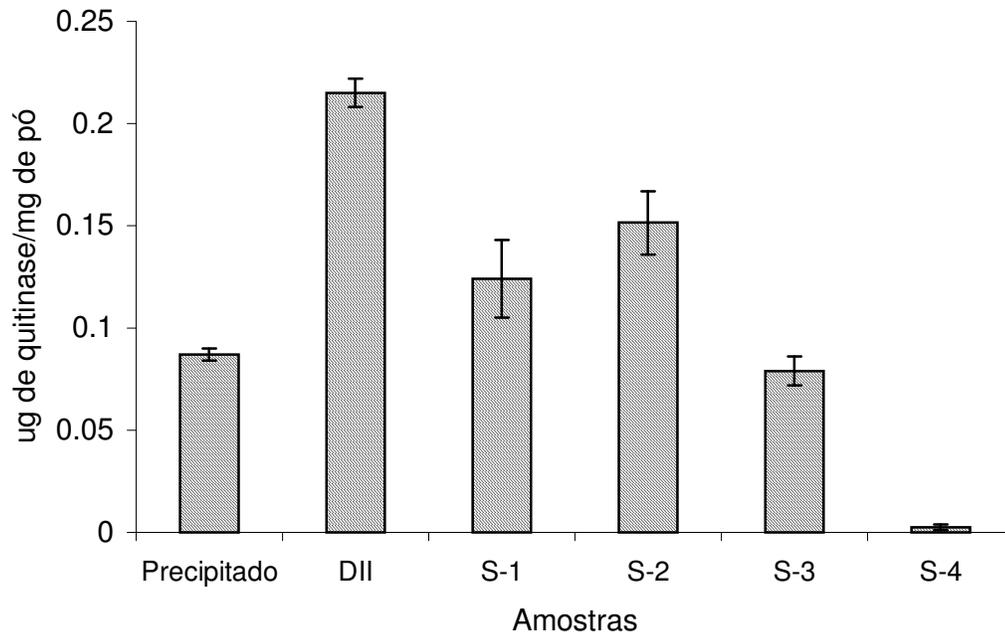


Figura 15 – Dosagem de quitinase no precipitado 0-90%, fração DII e frações da Sephacryl S-100. Resultados expressos em concentração de quitinase (μg) por mg de pó. Os ensaios foram realizados através de experimentos de ELISA, utilizando-se anticorpos anti-quitinase de *A. enanti* e *A. pavonina*.

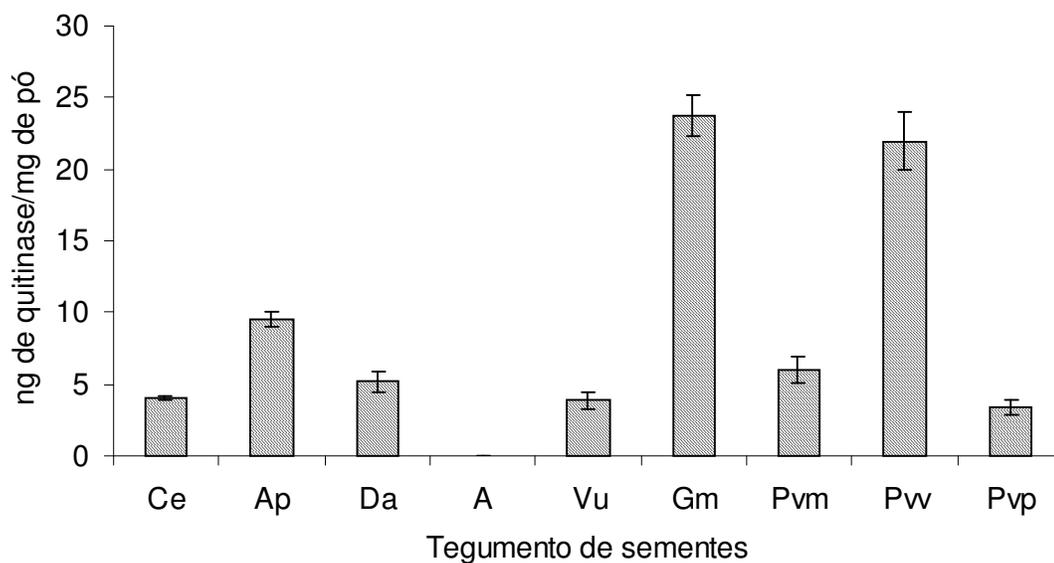


Figura 16 – Dosagem de quitinase em tegumento das sementes de *Canavalia ensiformis* (Ce), *Acanthaceae* (Ap), *Dalmanella* (Da), *Albizia* (A), *Phaseolus vulgaris* cv EPACE-10 (Vu), *Glycine max* (Gm), *Phaseolus vulgaris* cv manteiga (Pvm), *Phaseolus vulgaris* cv vermelho (Pvw) e *Phaseolus vulgaris* cv preto (Pvp). Resultados expressos em concentração de quitinase (μg) por mg de pó. Os ensaios foram realizados através de experimentos de ELISA, utilizando-se anticorpos anti-quitinase de *Acanthaceae*.

5.11– Atividade peroxidásica

A Figura 17 mostra os resultados da atividade peroxidásica na fração DII e nas frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100. Pode-se observar que a maior taxa de atividade desta enzima encontra-se na fração S-2 (382 unidades de atividade/mg/min), seguida pelas frações DII (266,6 unidades de atividade/mg/min) e S-3 (16,2 unidades de atividade/mg/min). As frações S-1 e S-4 apresentaram valores muito pequenos desta atividade: 2,06 e 0,7 unidades/mg/min, respectivamente.

5.12– Atividade inibitória de tripsina

Os resultados da atividade anti-trípica das frações da DEAE-Sepharose são apresentados na Figura 18, que mostra que houve inibição da atividade trípica em duas das frações testadas. A atividade inibitória de tripsina na DI foi cerca de 94% e na DII, aproximadamente 70%. A fração DIII não foi capaz de inibir a atividade da tripsina.

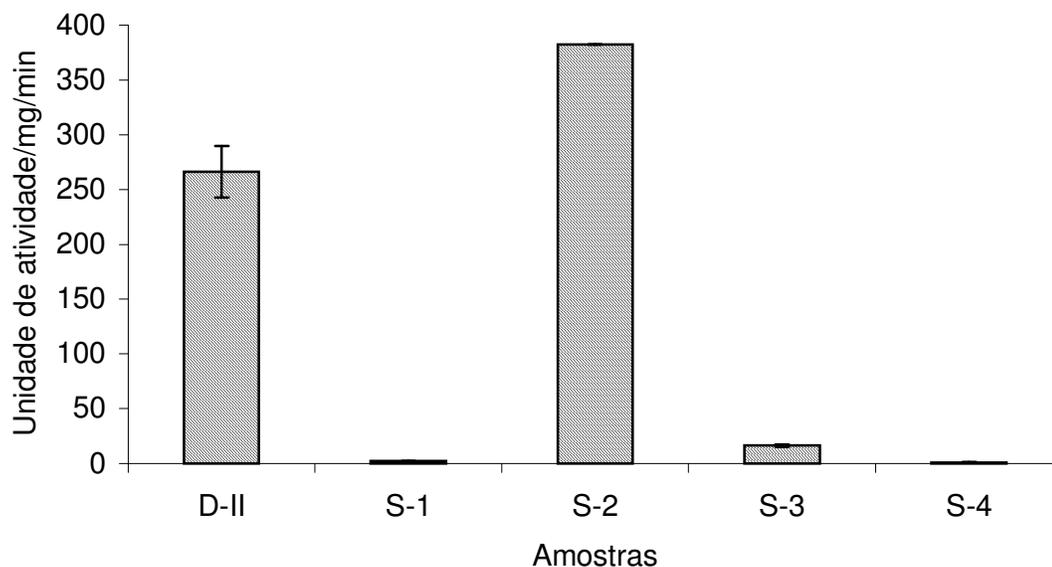


Figura 17 – Atividade peroxidásica da fração DII (DEAE-Sepharose) e das frações da Sephacryl S-100. As amostras foram incubadas usando 0,25% de guaiacol em peróxido de hidrogênio 10 mM e fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Resultados expressos em unidade de atividade por miligrama por minuto. Uma unidade de atividade peroxidásica é definida como a quantidade de enzima que catalisa um aumento de absorvância de 0,01 por minuto a 470 nm.

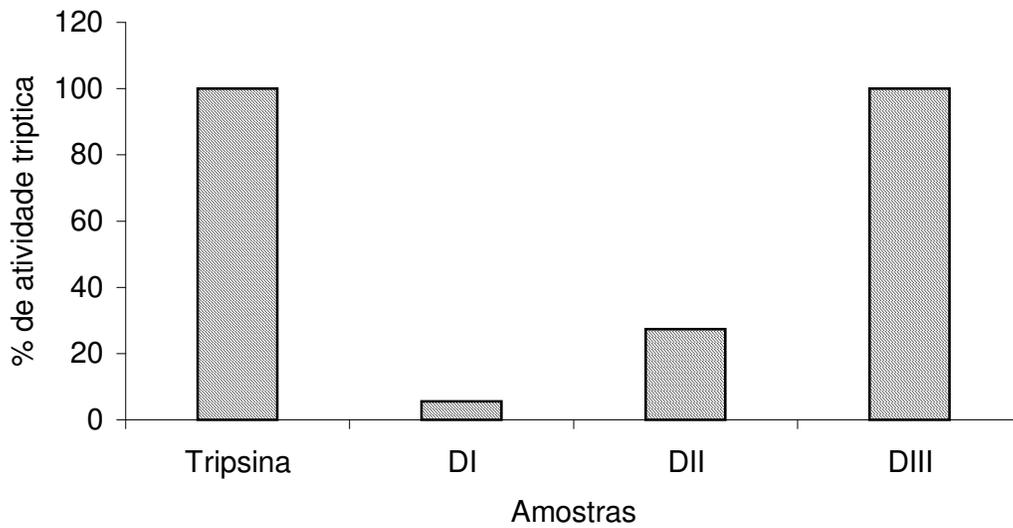


Figura 18 – Atividade triptica das frações do tegumento de soja obtidas em DEAE-Sepharose. As amostras foram incubadas usando BAPNA 1 mM em DMSO 1%, na presença de tripsina (20 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) em 50 mM de tampão em Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 20 mM pH 8,2. Concentração das amostras utilizadas no ensaio: DI (5 mg/mL), DII (6 mg/mL) e DIII (15 mg/mL).

5.13– Microscopia de luz para rotina das larvas de *C. maculatus* crescidas em sementes artificiais

Na Figura 19 são mostrados cortes semifinos longitudinais do trato intestinal de larvas de *Callosobruchus maculatus* controle (mantidas em sementes artificiais contendo apenas farinha de EPACE-10, susceptível a *C. maculatus*), processados para rotina e analisados por microscopia de luz. Verificam-se secções longitudinais das bordas do intestino das larvas de *C. maculatus*, com detalhe das microvilosidades e o lúmen do intestino em aumentos de 10 vezes (Painel A), 20 vezes (Painel B) e 40 vezes (Painel C).

5.14 – Imunohistoquímica

Com o intuito de confirmar a presença de quitinases nos órgãos das larvas de *C. maculatus*, secções das larvas desenvolvidas em sementes artificiais (não cobertas com tegumento) contendo 1% da fração S-3, obtida em Sephacryl S-100, foram analisadas por microscopia de luz. Embora a fração S-1 tenha sido a mais tóxica, não foi possível a utilização das larvas que se desenvolveram na presença dessa fração, porque tanto o número de larvas como os tamanhos das mesmas inviabilizaram esses experimentos. Desta forma, escolheram-se as larvas desenvolvidas na fração S-3 que, além de ter sido tóxica, embora menos que a fração S-1, também possui quitinase. Na Figura 20 (A e B), são mostrados os resultados do experimento controle, em que os cortes não foram incubados com o primeiro anticorpo. Nos cortes tratados com o anticorpo anti-quitinase, visualiza-se uma marcação nas bordas das microvilosidades intestinais, em aumento de 20 vezes (Painel C) e 40 vezes (Painel D), marcação essa que não ocorre nas secções de larvas controle (Painéis A e B).

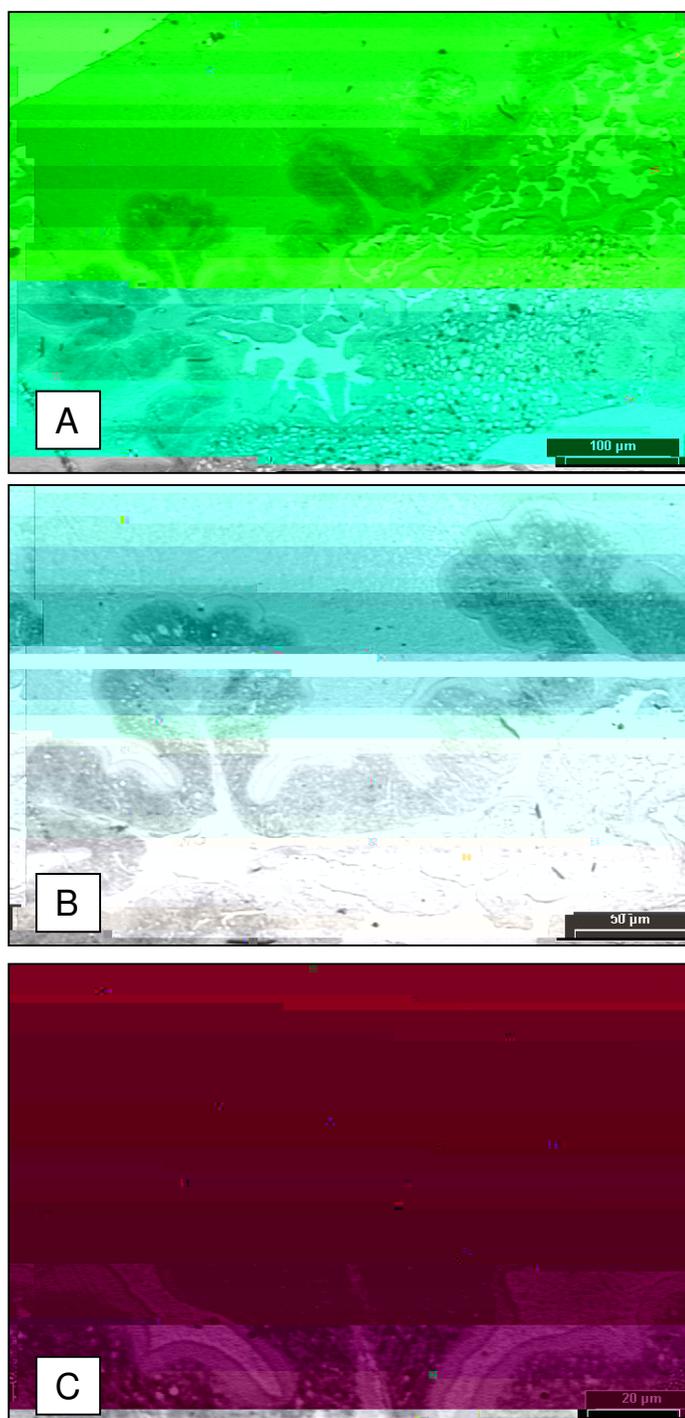


Figura 19 – Cortes histológicos de larvas de *C. maculatus* mantidas em sementes artificiais controle (preparadas apenas com farinha de EPACE-10), corados por azul de toluidina. (A) Secções das larvas no aumento de 10x. (B) Secções das larvas no aumento de 20x. (C) Secções das larvas no aumento de 40x.

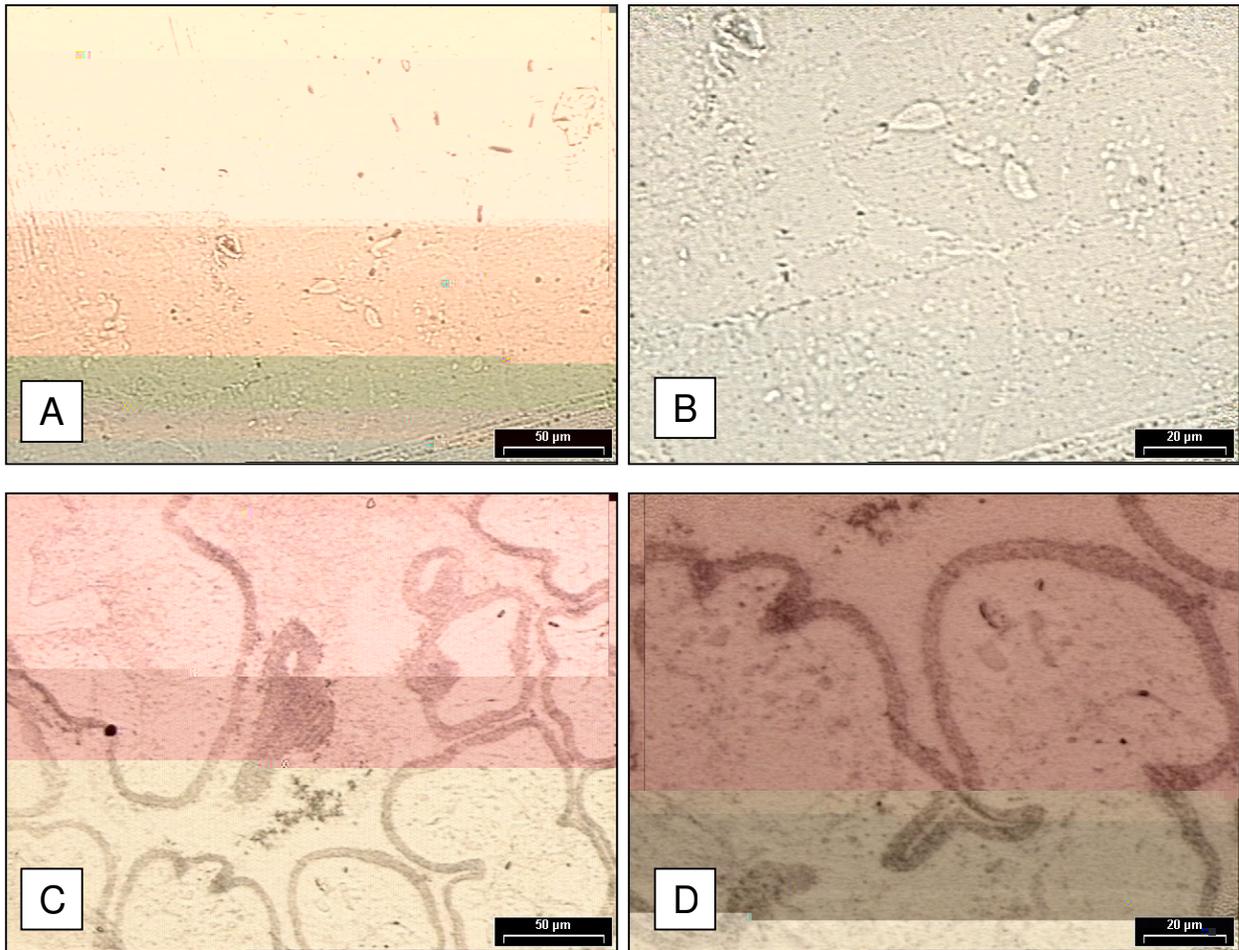


Figura 20 – Cortes histológicos de larvas de *C. maculatus* mantidas em sementes artificiais contendo 1% da fração S-3. (A) Secções das larvas incubadas apenas com o anticorpo anti-IgG de coelho complexado com partículas de ouro coloidal (10 nm) no aumento de 20x. (B) Secções das larvas incubadas apenas com o anticorpo anti-IgG de coelho complexado com partículas de ouro coloidal (10 nm) no aumento de 40x. (C) Secções das larvas incubadas com o anticorpo anti-quitinase de cotilédones de *A. pavonina* no aumento de 20x. (D) Secções das larvas incubadas com o anticorpo anti-quitinase de cotilédones de *A. pavonina* no aumento de 40x.

5.15– Toxicidade das frações cromatográficas sobre fungos fitopatogênicos

A Tabela 1 mostra o efeito das diferentes frações (DI, DII e DIII) obtidas em DEAE-Sepharose sobre o crescimento de fungos filamentosos após 48 h de incubação. Observa-se um efeito inibitório mais acentuado da amostra retida em DEAE-Sepharose, eluída com cloreto de sódio 0,5 M (DIII). A fração não retida (DI) não inibiu consideravelmente o crescimento dos fungos testados.

A fração não retida foi mais efetiva na inibição do fungo *Ustilago violacea*, sendo responsável por apenas 9% de inibição.

Pode-se observar ainda, que a fração DII mostrou uma fraca inibição tanto para *Ustilago violacea* (14,4%) quanto para *Ustilago maydis* (21%).

A fração retida em DEAE-Sepharose, eluída com cloreto de sódio 0,5 M, foi mais efetiva na inibição do fungo *Ustilago violacea*, pois em 48 h de crescimento houve aproximadamente 72% de inibição. Quando o fungo testado foi *Ustilago maydis*, esta fração também levou a uma inibição significativa, inibindo o crescimento em cerca de 66%, nesse mesmo período de tempo.

Tabela 1 – Efeito das frações obtidas após cromatografia em DEAE-Sepharose sobre o crescimento dos fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium lateritium*.

Espécie	Percentagem de inibição após 48 h de crescimento		
	DI	DII	DIII
<i>F. oxysporum</i>	5,3%	21%	66%
<i>F. lateritium</i>	9%	14,4%	72%

6. DISCUSSÃO

Em todo o mundo, perdas na produção agrícola sem o uso de pesticidas estão estimadas em 70% e apesar do uso de inseticidas, as perdas na pré e pós-colheita, devido o ataque de insetos, é de 15% da produção total (Araújo *et al.* 2005).

As sementes de leguminosas são uma importante fonte de alimento para a humanidade, entretanto, muitas perdas na produtividade dessas sementes são causadas pelo ataque de insetos e patógenos. Algumas espécies de bruquídeos, como o *Callosobruchus maculatus*, atacam sementes durante o armazenamento, afetando gravemente a qualidade do produto. O desenvolvimento de uma simples larva em grãos de feijão-de-corda pode levar a perda de peso de 8-22%, causando até 37% de perda da produção (Murad *et al.* 2006). Em períodos de grave infestação, perdas causadas por *C. maculatus* podem alcançar 100% das sementes armazenadas, dentro de um período de 6 meses (Hall *et al.* 1997).

A previsão de crescimento da população humana mundial indica que haverá necessidade de aumentar substancialmente a produção de alimento (Zhu-Salzman *et al.* 2005). Desde o início da década de 80, novas estratégias de controle de pragas, como o Manejo Integrado de Pragas (IPM) e o uso de safras transgênicas, têm sido propostas e testadas para evitar perdas de produção

baseado em

Algumas sementes conseguem se defender dessas pragas através de uma combinação de compostos químicos e fatores físicos. Nas últimas décadas, muitos trabalhos têm se dedicado a investigar um crescente número de substâncias produzidas por plantas, que participam direta ou indiretamente nos mecanismos naturais que as plantas desenvolveram para se defender contra insetos e patógenos em geral (Carlini *et al.* 1997; Gomes *et al.* 1997; Paes *et al.* 2000; Carvalho *et al.* 2001; Macedo *et al.* 2002; Agizzio *et al.* 2003).

Apesar dos grandes avanços nos estudos sobre os mecanismos de defesa das sementes, poucos trabalhos têm se dedicado ao estudo do envolvimento de proteínas dos tegumentos nesses mecanismos, sendo este tecido considerado exclusivamente uma estrutura que proporciona uma defesa física para a manutenção da integridade das sementes.

Através de experimentos com sementes de *Glycine max*, resultados do nosso grupo mostraram que estas conseguem impedir o desenvolvimento do bruquídeo *C. maculipes* (Santos, 2004). A mortalidade observada ocorre possivelmente devido à ingestão de componentes tóxicos presentes no tegumento da semente. Esse comportamento contrasta com o observado na maioria dos cultivares de *unguiculata*, a principal semente hospedeira desse bruquídeo, onde uma alta porcentagem de ovos eclode (90%) e 80 a 90% das larvas sobrevivem após atravessarem o tegumento e os cotilédones da semente, dando origem a insetos adultos (Xavier-Filho *et al.* 1989). Entretanto, nossos resultados assemelham-se aos observados por Moraes *et al.* (2000) em sementes de *P. asedus natus*, que assim como a soja, não é uma semente hospedeira desse bruquídeo.

No presente trabalho, para confirmar a participação do tegumento na resistência dessa semente ao ataque do inseto, foi utilizado um sistema de sementes artificiais cobertas com tegumento natural de soja. Os resultados obtidos mostraram que, apesar de um grande número de larvas ter atravessado o tegumento (93%), estas apresentavam metade da massa das larvas que atravessaram o tegumento de *unguiculata* (semente onde o inseto se desenvolve naturalmente), evidenciando a toxicidade do tegumento de soja para larvas de *C. maculipes*. Toxicidades mais elevadas foram observadas para as outras sementes testadas: *Canavalia ensiformis*, *Dalmanella*, *Abutilon* e os três cultivares de *P. asedus natus*.

uma manteiga vermelho, vermelho e manteiga. Pode-se destacar as sementes artificiais cobertas com tegumento de *A. z.* sp, em que as larvas não foram encontradas dentro do ovo e, no entanto, estes ovos apresentaram furos na superfície superior, indicando que as larvas saíram por esses furos e

quantidade de amostra obtida não foi suficiente para a realização deste experimento. Das frações testadas, a fração DII mostrou-se mais tóxica para as larvas desse inseto que a fração DI, pois em concentração de 1,14%, foi capaz de reduzir a massa das larvas em 50% (WD₅₀).

Avaliando-se o conteúdo protéico do tegumento de soja, por SDS-PAGE, observamos a presença de uma variedade de bandas protéicas, com massas moleculares de aproximadamente 43 e 36 kDa (fração DI), 23, 25 e 29 kDa (fração DII) e proteínas com massas que variam de 15 a 27 kDa (fração DIII).

Em estudos sobre o tegumento de soja já foram identificadas as seguintes proteínas: peroxidase, quitinase, extensina, uma proteína denominada SC24, inibidor do tipo Bowman-Birk, inibidor do tipo Kunitz e uma proteína hidrofóbica (HPS) (Cassab *et al.* 1985; Gillikin e Graham, 1991; Welinder, 1992; Gijzen *et al.* 1993; Gijzen *et al.* 1999; Gijzen *et al.* 2001). Desta forma, a presença de algumas dessas proteínas foram investigadas nas frações obtidas. A presença de bandas protéicas próximas a 45 kDa com atividade peroxidásica foi detectada em todas as frações testadas, com exceção da fração não retida em DEAE-Sepharose. Essa banda foi mais forte no precipitado e na fração eluída da DEAE-Sepharose com NaCl 0,25 M (DII). Atividade fosfatásica também está presente nas três frações obtidas na DEAE-Sepharose. Entretanto, a maior atividade fosfatásica foi observada na fração DII (retida em DEAE, eluída com cloreto de sódio 0,25 M). A banda protéica de 24 kDa presente na fração DIII foi submetida a seqüenciamento de aminoácidos e apresentou uma seqüência parcial 85% homóloga à fosfatase ácida de *S. necopolis*.

Enzimas como peroxidases, glucosidasas e esterases participam das reações de defesa de plantas superiores, sendo geralmente secretadas no meio (Nishizaki *et al.* 1996). Uma fosfatase ácida recombinante de *A. baobab* foi capaz de atrasar o desenvolvimento e aumentar a mortalidade de insetos coleópteros e dípteros, quando incorporada em sementes artificiais, sugerindo o papel desta proteína na defesa contra insetos herbívoros (Liu *et al.* 2005). Muitos papéis têm sido atribuídos às fosfatases ácidas em plantas, como a participação na transdução de sinal (Plaxton, 1996), a regulação do metabolismo de desfosforilação de proteínas (Duff *et al.* 1994) e a liberação de fosfato inorgânico no meio, a partir de

fosfato orgânico (Lefebvre *et al.* 1990). Um importante papel no metabolismo de plantas pode ser exercido pelas fosfatases, já que essas enzimas, purificadas de cotilédones de sementes de soja, catalisam reações usando como substratos intermediários chave da via glicolítica como glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e fosfoenol-piruvato (Ferreira *et al.* 1999).

O papel das peroxidases no mecanismo de resistência de plantas está estabelecido e tem sido correlacionado com o aumento de suas atividades após inoculação de fitopatógenos em arroz, trigo e cevada (Kerby e Somerville, 1989; Young *et al.* 1995; Mohammadi e Kazemi, 2002).

Em virtude das vicilinas exercerem um papel reconhecido na defesa de sementes (Macedo *et al.* 1993; Sales *et al.* 1996; Yunes *et al.* 1998; Sales *et al.* 2001), além de sua participação como reserva, foram analisadas as proteínas do tegumento visando identificar a presença de vicilinas. Para isso, foram realizados experimentos de "Western blotting" utilizando anticorpo anti-vicilina de *Phaseolus vulgaris*, cv EPACE-10. Observou-se a presença de bandas protéicas que reagiram com o anticorpo, indicando a presença de proteínas do tipo vicilina nesses tecidos. Através do método de ELISA, foi quantificada a concentração de vicilina na farinha do tegumento, no precipitado 90% e nas frações da DEAE-Sepharose, constatando-se que essas proteínas representam cerca de 0,005% da massa seca da farinha do tegumento e equivalem a 0,59% de todas as proteínas presentes. Esses resultados reforçam o papel defensivo dos tegumentos, visto que proteínas do tipo vicilina presentes nesses tecidos vêm sendo descritas na literatura como potencialmente tóxicas contra *C. maculatus* (Oliveira *et al.* 1999; Moraes *et al.* 2000; Silva *et al.* 2004) e fungos fitopatogênicos (Gomes *et al.* 1997).

Quitinases são hidrolases envolvidas na defesa de plantas contra insetos e patógenos, incluindo fungos. A atividade dessas proteínas consiste principalmente na capacidade de atuarem sobre a quitina. Vários trabalhos têm mostrado a presença constitutiva de quitinases em plantas e suas atividades antifúngica e inseticida (Huynh *et al.* 1992; Gomes *et al.* 1996). Uma proteína antifúngica com seqüência N-terminal similar a quitinase foi isolada de *Dolichos biflorus*. A proteína, denominada doliquina, possui massa molecular de 28 kDa. Doliquina exerce forte atividade antifúngica contra *Phytophthora sojae*, além de atividade inibitória contra a

transcriptase reversa de HIV-1, α e β -glucosidases (Ye *et al.* 2000). Uma proteína do tipo quitinase, também de 28 kDa, foi isolada de sementes de feijão-de-corda (*Phaseolus vulgaris*), *Phaseolus vulgaris* cv pinto e *Desmodium illinoense* (Ng, 2004). Santos *et al.* (2004) purificaram, caracterizaram e imunolocalizaram uma quitinase de sementes de *Azadirachta indica* e *Azadirachta indica*. A enzima, com massa molecular de aproximadamente 30 kDa, foi localizada principalmente em compartimentos citosólicos e detectada em exudados liberados pela semente durante a germinação.

Sabendo-se do papel das quitinases na defesa de plantas, a presença de quitinase em frações do tegumento de soja (DI, DII e DIII) foi analisada através de "Western blotting", utilizando-se anticorpo produzido contra quitinase de cotilédones de *Azadirachta indica* e *Azadirachta indica*. Bandas protéicas reativas contra o anticorpo anti-quitinase estavam presentes na fração DII.

A fração que apresentou maior toxicidade para larvas de *C. maculipes* (DII) foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-100. O perfil cromatográfico obtido mostrou 4 picos: S-1, S-2, S-3 e S-4, que tiveram sua atividade tóxica testada para *Callosobruchus maculipes*, através de um sistema de sementes artificiais em concentração de 1%. Observou-se que as frações S-1 e S-3 foram as mais tóxicas.

Através de experimentos de ELISA, foi quantificada a concentração de quitinase nas frações do tegumento de soja (precipitado, DII, S-1, S-2, S-3, S-4) e na farinha do tegumento das seguintes sementes: *Canavalia ensiformis*, *Azadirachta indica*, *Dalmanella alata*, *Azadirachta indica* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* (manteiga), *Phaseolus vulgaris* (vermelho) e *Phaseolus vulgaris* (preto). Dentre as frações do tegumento de *G. max*, a maior concentração de quitinase foi observada na fração DII (0,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$). As frações da Sephacryl S-100, S-1 e S-2 apresentaram quantidades bastante aproximadas de quitinase: 0,143 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 0,136 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente.

Analisando-se a farinha do tegumento de sementes, a maior quantidade de proteínas imunorreativas com o anticorpo anti-quitinase (cerca de 22,5 ng/mg) foi detectada em sementes de soja e feijão comum (cv vermelho). Comparando-se com as outras amostras, esse valor é, por exemplo, cerca de seis vezes maior que o das farinhas de tegumento de *Phaseolus vulgaris* cv EPACE-10 e *P. vulgaris* preto. Em

A *enanti* e a *pavonina*, a semente da qual o anticorpo foi produzido, foram detectados 9,5 ng da enzima por mg de pó. No tegumento de *P. vulgaris* cv manteiga, a quitinase representa cerca de 6 ng/mg da farinha deste tecido. Em *Canavalia ensiformis*, 4 ng/mg e *D. glabra* a mesma, possui cerca de 5 ng/mg. Vale ressaltar que, devido ao fato de não se poder garantir que o grau de reatividade das quitinases presentes nas diversas sementes seja semelhante ao anticorpo usado, talvez esses dados não possam ser comparáveis entre si. A não detecção de quitinase no tegumento de *A. nap* indica que o fator de resistência desta semente para *C. maculipes* não está relacionado à presença dessa enzima.

Os resultados dos ensaios de determinação da atividade peroxidásica mostram a confirmação da atividade desta enzima na fração DII, o que também foi observado nas frações S-2 e S-3, obtidas na cromatografia de exclusão molecular. Esses resultados sugerem a presença de mais de uma isoforma dessa enzima no tegumento de sementes de soja. Vários experimentos sugerem o envolvimento de peroxidases vegetais, não apenas em processos biossintéticos relacionados ao desenvolvimento da parede celular como na lignificação e suberização, mas também na regulação da elongação da parede e na resistência contra infecção por patógenos. Tão amplo espectro de funções é consistente com a presença de várias isoformas, sugerindo que diferentes isoenzimas podem estar envolvidas em distintos processos. Além disso, peroxidases podem ser considerados marcadores úteis para estresses ambientais, visto que sua atividade é detectada por baixa temperatura, poluição de ar, ozônio, metais pesados, injúria, sais, ataque por patógeno e radiação UV (Caruso *et al.* 2001).

Estudos anteriores mostraram também a presença de inibidores de tripsina no tegumento de soja (Kunitz, 1945 apud Gijzen *et al.* 2001; Kapoor e Gupta, 1978; Sessa e Wolf, 2001). No presente trabalho, a inibição da atividade trípica foi analisada após incubação da tripsina com as frações do tegumento de soja obtidas em DEAE-Sepharose. Os resultados mostraram que a fração não retida (DI) e a fração retida eluída com NaCl 0,25M (DII) apresentaram alta atividade inibitória, 94% e 70%, respectivamente, sugerindo a presença deste inibidor nestas frações. Os inibidores de proteases são conhecidos por seus papéis em resposta a estresses abióticos (Franco e Melo, 2000; Pernas *et al.* 2000) e bióticos, especialmente em

processos de defesa de plantas contra o ataque de insetos praga (Gatehouse e Gatehouse, 1998), sendo efetivos contra enzimas digestivas de insetos. Girard *et al.* (1998) observaram que os inibidores orizacistatina e Bowman-Birk mostraram uma potente atividade inibitória contra proteinases intestinais de *P. gossypiella* (F.). Observações similares foram feitas quando experimentos foram realizados com proteinases serínicas da traça do tomateiro, *Lacanobia oleracea*, que foram inibidas por SKTI (inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz) e CpTI (Inibidor de tripsina do feijão-de-corda) (Gatehouse *et al.* 1999). Estas observações também estão de acordo com relatos para *Plutella maculipennis* e outros lepidópteros, nos quais SKTI foi o mais efetivo entre os inibidores testados (Ahmad *et al.* 1980; Johnston *et al.* 1991; Ferreira *et al.* 1994; Johnston *et al.* 1995). Outros estudos têm demonstrado que estes inibidores são altamente ativos *in vivo* e *in vitro*, quando os insetos foram alimentados com uma dieta artificial contendo inibidores (Gatehouse *et al.* 1999; Franco *et al.* 2003). Ensaios *in vitro* mostraram que o inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz foi capaz de inibir atividades digestivas do tipo serina proteinase de larvas e insetos adultos do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Larvas neonatas criadas em dieta artificial contendo SKTI apresentaram aumento na mortalidade e graves deformidades das larvas, pupas e insetos adultos (Franco *et al.* 2004). Um inibidor de tripsina isolado de sementes de *A. nanus* e *A. pavonis*, ApTI, foi altamente efetivo contra proteinases digestivas de *C. maculipes*, *Anticarsus oleraceus* e *A. oleraceus*. Em *C. maculipes* alimentados com dieta artificial contendo 0,25% e 0,5% de ApTI (w/w), a maior concentração causou 50% de mortalidade e reduziu o ganho de massa das larvas em aproximadamente 40% (Macedo *et al.* 2004).

Neste trabalho, a confirmação da presença de quitinases de tegumento de sementes de *G. max*, nos órgãos das larvas de *C. maculipes*, foi realizada. Os resultados da imunolocalização de quitinase mostraram que moléculas presentes nas bordas das microvilosidades intestinais das larvas de *C. maculipes*, mantidas em sementes artificiais contendo 1% da fração S-3, foram reativas com o anticorpo anti-quitinase. Apesar da fração S-3 não ter sido a mais rica em quitinase, foi uma das mais tóxicas para *C. maculipes* quando incorporada em sementes artificiais. Além disso, as larvas obtidas nessas sementes apresentavam tamanho possível de

manipulação na preparação para microscopia. Outros trabalhos mostram a detecção de proteínas tóxicas a insetos em vários órgãos. Paes *et al.* (2000) mostraram a detecção de arcelinas de *P. vulgaris* na hemolinfa, lúmen intestinal e em vesículas celulares de *Acanthoscelus lectus* e *A. oles subascatus*. Proteínas de reserva presentes nas bordas das microvilosidades do intestino médio de larvas de *C. maculius* foram reconhecidas por imunomarcção de vicilinas. Estes sítios de marcação coincidem com os locais de marcação com o anticorpo anti-quitina, confirmando resultados anteriores de ligação de vicilinas a matrizes de quitina (Sales *et al.* 2001). Recentemente, proteínas do tipo vicilinas de sementes de *unguiculata* foram detectadas na hemolinfa, no lúmen intestinal, nas células do epitélio intestinal, no corpo gorduroso, e nos túbulos de Malpighi de larvas de *C. maculius* e também, na hemolinfa de larvas de *A. oles subascatus* e corpo gorduroso de insetos adultos, mostrando a ação sistêmica dessa proteína (Uchôa, 2006; Uchôa *et al.* 2006). Assim como as vicilinas, GNA (lectina de *Gaussia nivalis*) e ConA (lectina de *Canavalia ensiformis*), quando incluídas em dieta semi-artificial e oferecidas a larvas de *Lacania oleracea*, acumularam-se no intestino, túbulos de Malpighi e na hemolinfa, indicando que ambas as lectinas foram internalizadas e distribuídas sistemicamente após ligarem-se a glicoproteínas presentes ao longo do trato digestivo do inseto (Fitches *et al.* 2001). As lectinas são consideradas agentes biológicos efetivos contra o ataque de insetos. Embora o modo preciso da ação inseticida de lectinas vegetais não seja completamente conhecido, acredita-se que a resistência à degradação proteolítica por enzimas digestivas e a ligação a estruturas do intestino são os dois pré-requisitos básicos para que essas proteínas exerçam seus efeitos deletérios em insetos (Vasconcelos, 2004).

Os resultados deste estudo mostraram o efeito das frações obtidas em DEAE-Sepharose sobre o crescimento dos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* e *Trichoderma reesei*. Foi observado um efeito inibitório mais acentuado da amostra retida em DEAE-Sepharose, eluída com NaCl 0,5 M (DIII). Várias classes de proteínas antifúngicas estão envolvidas na inibição da síntese da parede celular dos fungos ou rompem a estrutura da parede; outras desfazem a estrutura da membrana do fungo, resultando na lise da célula fúngica (Selitrennikoff, 2001). A ação inibitória

Os resultados obtidos neste estudo apontam algumas moléculas que separadamente ou através de um efeito sinérgico podem estar contribuindo para a capacidade que as sementes de *G. max* têm de se defender contra o ataque do bruquídeo *C. maculatus* e a penetração de patógenos, como os fungos fitopatogênicos estudados.

7. CONCLUSÕES

- Os tegumentos das sementes *Glycine max*, *A. enani* e *a pavon na*, *Ab. za sp*, *D. odia a. ss ma*, *Canava. ens. m. s.* e *P. ased. s. vulg. a. s.* (cultivares manteiga vermelho, vermelho e manteiga) interferiram no desenvolvimento normal das larvas de *C. macul. ius* desenvolvidas em sementes artificiais;
- As frações DI e DII (obtidas em DEAE-Sepharose) foram altamente tóxicas para larvas de *C. macul. ius*;
- Uma proteína presente na fração retida em DEAE-Sepharose apresentou seqüência parcial de aminoácidos com 85% de homologia com a fosfatase ácida de *S. nec. op. si. s. sp*;
- Atividade fosfatásica em gel nativo foi detectada nas frações da DEAE-Sepharose;
- As frações S-1 e S-3 (obtidas em Sephacryl S-100) foram altamente tóxicas para larvas de *C. macul. ius*;
- Proteínas do tipo quitinases estavam presentes nas frações DII, S-1, S-2, S-3, e na farinha do tegumento das sementes *Canava. ens. m. s.*, *A. enani* e *a pavon na*, *D. odia a. ss ma*, *goa. rug. vulg. ia*, *Glycine max*, *P. ased. s. vulg. a. s.* (cultivares manteiga, vermelho e preto);
- Atividade peroxidásica foi detectada nas frações retidas em DEAE-Sepharose e nas frações S-2 e S-3;
- A atividade anti-tríptica verificada na fração DI foi cerca de 94% e na DII, aproximadamente 70%;
- Quitinases estão presentes no trato intestinal das larvas de *C. macul. ius* desenvolvidas em sementes artificiais contendo 1% da fração S-3, obtida em Sephacryl S-100;

- As frações obtidas em DEAE-Sepharose foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A fração DIII mostrou-se mais tóxica, inibindo o crescimento do *Staphylococcus aureus* em cerca de 70%.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahamad, Z., Saleemuddin, M., Siddi, M. (1980) Purification and characterization of three alkaline proteinases from the midgut of the larvae of army worm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem.* 10: 667-673.
- Agizzio, A. P., Carvalho, A. O., Ribeiro, S. de F. F., Machado, O., L., T., Alves, E. W., Okorokov, L. A., Samarão, S. S., Bloch Jr., Prates, M. V., Gomes, V. M. (2003) A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 188-195.
- Agrios, G. N. (1988) How plants defend themselves against pathogens. *In: Plant Pathology*. 3rd. London: Academic Press, London, p. 97-115.
- Algan, G., Büyükkartal, H. N. B. (2000) Ultrastructure of seed coat development in the natural tetraploid *Triticum polypoides* L. *J. Agron. Crop Sci.* 184: 205-213.
- Araújo, C. L., Bezerra, I. W. L., Oliveira, A. S., Moura, F. T., Macedo, L. L. P., Gomes, C. E. M., Barbosa, A. E. A. D., Macedo, F. P., Souza, T. N. M. S., Franco, O. L., B-J., C., Sales, M. P. (2005) *In vitro* bioinsecticidal activity toward *Ceatomia capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *in vitro* bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. *Agrochimica* 53 (11): 4381-4387.
- Bastos, J. A. M. (1981) Principais pragas de cultivares e seus controles. *Agrochimica* 50-84.
- Benhamou, N., Broglie, K., Chet, I., Broglie, R. (1993) Cytology of infection of 35S bean chitinase transgenic canola plants by *Fusarium solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown. *In: Plant Pathology*. 4: 295-305.
- Bewley, J. D., Black, M. (1994) Seeds: Physiology of Development and Germination. 2nd. New York: Plenum Press, p. 1-31.

- Bode, W., Huber, R. (2000) Structural basis of the endoproteinase protein inhibitor interaction. *Biochem Biophys Acta* 1477: 241-252.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brandão, S. S. (1961) Contribuição ao Estudo de Variedades de Soja. *Revista Brasileira de Genética* 1(4): 99-119.
- Broekaert, W. F., Lee, H. I., Kush, A., Chua, N-R., Raikhel, N. (1990) Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87: 7633-7637.
- Carlini, C. R., Oliveira, A. E. A., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M. A. (1997) Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *Insect Biochem Mol Biol* 90: 340-348.
- Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F. (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 40(11): 1515-1539.
- Carlson, J. B. (1973) Estimating surface area of soybean root systems. *Plant Soil* 36 (1): 16-19.
- Caruso, C., Chilosi, G., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., Buonocore, V., Caporale, C. (2001) A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytopathology* 58: 743-750.
- Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J., Cooper, J. B., van Holst, G. J., Varner, J. E. (1985) A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant Physiol* 77: 532-535.
- Cassab, G. I., Varner, J. E. (1987) Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *Cellulose Chem Technol* 105 (6): 2581-2588.

- Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Cunha, M., Santos, I. S., Gomes, V. M. (2001) Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *gossypium hirsutum* seeds. *Int J Food Microbiol.* 39: 137-146.
- Chesin, M., Zipf, A. E. (1990) Alarm systems in higher plants. *Biol. Rev.* 55: 193-235.
- Copland, L. O., McDonald, M. B. (1985) Principles of seeds science and technology. 2.nd. New York: Macmillan Publishing Company, p. 34-49.
- Dhaubhadel, S., Kufli, K., Romero, M. C., Gijzen, M. (2005) A soybean seed protein with carboxylate-binding activity. *J. Exp. Bot.* 1-10.
- Ding, X., Gopalakrishnan, B., Johnson, L. B., White, F. F., Wang, X., Morgan, T. D., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. (1998) Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res.* 7(2): 77-84.
- Duff, S. M. G., Sarath, G., Plaxton, W. C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorous metabolism. *Plant Physiol.* 90: 791-800.
- Duranti, M., Barbiroli, A., Scarafoni, A., Tedeschi, G., Morazzoni, P. (2003) One-step purification of Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Protein Expr. Purif.* 30: 167-170.
- Esau, K. (1974) Anatomia das Plantas com Sementes. 2.ed. Reimpressão 1998. São Paulo: Edgard Blücher, p. 256-262.
- Ferreira, C., Capella, A. N., Sitnik, R., Terra, W. R. (1994) Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spooptea ugandensis* (Lepidoptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 107: 631-640.
- Ferreira, C. V., Granjeiro, J. M., Taga, E. M., Aoyama, H. (1998) Multiple forms of soybean seed acid phosphatases. Purification and characterization. *Int J Food Microbiol.* 36: 487-494.
- Ferreira, C. V., Taga, E. M., Aoyama, H. (1999) Glycolysis intermediates as substrates of acid phosphatases from soybean seeds. *Int J Food Microbiol.* 147: 49-54.
- Fields, P. G., Xie, Y. S., Hou, X. (2001) Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 37: 359-370.

- Firmino, F., Fernandes, K. V. S., Sales, M. P., Gomes, V. M., Miranda, M. R. A., Domingues, S. J. S., Xavier-Filho, J. (1996) Cowpea (*Cajanus cajan*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Acanthoscelus obtectus*. *Braz. J. Biol. Res.* 29: 749-756.
- Fitches, E., Woodhouse, S. D., Edwards, J. P., Gatehouse, J. A. (2001) In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galenium nivalis*) agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis* Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia adonacea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *J. Insect Physiol.* 47: 777-787.
- Fitches, E., Wilkinson, H., Bell, H., Bown, D. P., Gatehouse, J. A., Edwards, J. P. (2004). Cloning, expression and functional characterisation of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia adonacea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 1037-1050.
- Franco, O. L., Dias, S. C., Magalhães, C. P., Monteiro, A. C. S., Bloch Jr., C., Melo, F. R., Oliveira-Neto, O. B., Monnerat, R. G., Grossi-de-Sá, M. F. (2004) Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytoparasitology* 65: 81-89.
- Franco, O. L., Grossi-de-Sá, M. F., Sales, M. P., Mello, L. V., Oliveira, A. S., Rigden, D. J. (2002) Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Protein Expr. Purif.* 49: 335-341.
- Franco, O. L., Melo, F. R. (2000) Osmoprotectants, a plant strategy in response to osmotic stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 47: 137-144.
- Franco, O. L., Santos, R. C., Araújo, M. A. M., Mendes, A. C. M., Batista, J. A. N., Monnerat, R. G., Grossi-de-Sá, M. F., Freitas, S. M. (2003) Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytoparasitology* 63: 343-349.
- Fukuda, M., Matsui, M., Takaoka, M., Kakuta, S., Hamazu, Z., Toyosawa, L. (1994) Distribution of glycine-rich protein in soybean seed tissue and characterization of the separated protein. *Japan Soc. Sugar Cane Res.* 41: 48-50. Apud Sessa, D. J., Wolf, W. J. (2001) Bowman-Birk inhibitors in soybean seed coats. *In*

- C. ops* *P. o.* 14: 73-83.
- Gabard, K. A., Jones, R. L. (1986) Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. *Phy. s. d. P. ni* 67: 182-192.
- Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A. (1998) Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect resistant transgenic crops. *Pest. Sc.* 52: 165-175.
- Gatehouse, A. M. R., Norton, E., Davison, G. M., Babbe, S. M., Newell, C. A., Gatehouse, J. A. (1999). Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacania* *a. d. acea*: effects of plant proteinase inhibitor in vitro and in vivo. *J. Insect Physiol.*, 45: 545-558.
- Gellatly, K., Moorhead, G. B. G., Duff, S. M. G., Lefebvre, D. D., Plaxton, W. C. (1994) Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase. *P. ni Phy. s. d.* 106: 223-232.
- Gijzen, M., Kuflu, K., Qutob, D., Chernys, J. T. (2001) A class I chitinase from soybean seed coat. *Exp. Bot.* 52 (365): 2283-2289.
- Gijzen, M., Miller, S. S., Kuflu, K., Buzzell, R. I., Miki, B. L. A. (1999) Hydrophobic protein synthesized in the pod endocarp adheres to the seed surface. *P. ni Phy. s. d.* 120: 951-959.
- Gijzen, M., van Huystee, R., Buzzell, R. I. (1993) Soybean seed coat peroxidase. A comparison of high-activity and low-activity genotypes. *P. ni Phy. s. d.* 103: 1061-1066.
- Gillikin, J. W., Graham, J. S. (1991) Purification and development analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max.* *P. ni Phy. s. d.* 96: 214-220.
- Girard, C., Le Metayer, M., Bonadé-Bottino, M., Pham-Delegue, M-H., Jouanin, L. (1998) High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 229-237.
- Gomes, V. M., Mosqueda, M. I., Blanco-Labra, A., Sales, M.P., Fernandes, K. V. S.,

- Cordeiro, R. A., Xavier-Filho, J. (1997) Vicilin storage proteins from *Cajanus cajan* (legume) seeds inhibit fungal growth. *Agrochimica* 45(10): 4110-4115.
- Gomes, V. M., Oliveira, A. E. A., Xavier-Filho, J. (1996) A chitinase and a β -1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* (Walp)) inhibit growth of fungi and insect pests of the seed. *Scientia Agricola* 72: 86-90.
- Gomes, V. M., Xavier-Filho, J. (1994) Biochemical defenses of plants. *Brasileira de Tecnologia* 37 (2): 371-383.
- Gonzalez, R., Valera, J., Carreira, J., Polo, F. (1995) Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* 346: 48-49.
- Granjeiro, P. A., Ferreira, C. V., Granjeiro, J. M., Taga, E. M., Aoyama, H. (1999) Purification and kinetic properties of castor bean seed acid phosphatase containing sulphhydryl groups. *Physiological Plant* 107: 151-158.
- Hall, A. E., Singh, B. B., Ehlers, J. D. (1997) Cowpea breeding. *Plant Breeding Review* 15: 217-274.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E. M, Kuc, J. (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant* 20: 73-82.
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., Gajhede, M. (2001) Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Plant Science* 10: 108-115.
- Hirano, H., Kagawa, H., Okubo, K. (1992) Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. *Phytochemistry* 31 (3): 731-735.
- Huynh, Q. K., Hironaka, C. M., Levine, E. B., Smith, C. E., Borgmeyer, J. R., Shah, D. M. (1992) Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *Biotechnology* 267: 6635-6640.

- Janzen, D. H. (1977) How southern cowpea weevil larvae (Bruchidae: *Callosobruchus maculatus*) die on nonhost seeds. *Ecology* 58: 921-927.
- Johnston, K. A., Lee, M., Gatehouse, J. A., Anstee, J. H. (1991) The partial purification and characterization of serine proteinase activity in midgut of larval *Leptoglyphus angustatus*. *Insect Biochem.* 21: 389-397.
- Johnston, K. A., Lee, M., Brough, C., Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A. (1995). Proteinases activity in the larval midgut of *Leptoglyphus angustatus*: evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 375-383.
- Kamal, J. K. A., Behere, D. V. (2003) Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase. *Inorg. Biochem.* 94: 236-242.
- Kapoor, A. C., Gupta, Y. P. (1978). Trypsin inhibitor activity in soybean seed as influenced by storage of its development and different treatments, and the distribution in its anatomical parts. *Indian J. Diet.* 15: 429-433.
- Kennedy, A.R. (1998) Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 78, 167-209.
- Kerby, K., Somerville, S. (1989) Enhancement of specific intercellular peroxidase following inoculation of barley with *Pyrenopeziza graminis* sp. *Phytopathol.* 79: 323-337.
- Kogan, M. M. (1986) Natural Chemicals in Plant Resistance to Insects. *Iowa State J. Res.* 60: 501-527.
- Kozlowski, T. T. (1972) Seed Biology. Germination control, metabolism, and pathology. 2.nd. New York: Academic Press, v.2, p. 4-1114.
- Kunitz, M. (1945) Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101: 668-669. Apud Gijzen, M., Kufli, K., Qutob, D., Chernys, J. T. (2001) A class I chitinase from soybean seed coat. *Exp. Bot.* 52 (365): 2283-2289.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Lefebvre, D. D., Duff, S. M. G., Fife, C., Plaxton, W. C. (1990) Response to phosphate deprivation in *Bassora naga* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi-absorption rate. *Plant Physiology* 93: 504-511.
- Liu, Y., Ahn, J. E., Datta, S., Salzman, R. A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L. L., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K. (2005) Arabidopsis vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. *Plant Physiology* 139: 1545-1556.
- Macedo, M. L. R., Andrade, L. B. S., Moraes, R. A., Xavier-Filho, J. (1993) Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Cajanus cajan*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 105C (1): 88-94.
- Macedo, M. L. R., de Matos, D. G. G., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. (2000) Trypsin inhibitor from *Dioscorea alata* seeds: purification and properties. *Phytochemistry* 54: 553±558.
- Macedo, M. L. R., de Sá, C. M., Freire, M. D., Parra, J. R. (2004) A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Antennaria pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *Agrochimica* 52(9): 2533-2540.
- Macedo, M. L. R., Mello, G. C., Freire, M. G. M., Novello, J. C., Marangoni, S., Matos, D. G. G. (2002) Effect of a trypsin inhibitor from *Dioscorea alata* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 891-898.
- Ma, F., Cholewa, E., Mohamed, T., Petersen, C. A., Gijzen, M. (2004) Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Ann. Bot.* 94: 213-228.
- Malhotra, O. P., Kayastha, A. M. (1990) Isolation and characterization of phosphoenolpyruvate phosphatase from germinating mung beans (*Vigna radiata*). *Plant Physiology* 93: 194-200.
- Melo, V. M. M., Vasconcelos, I. M., Gomes, V. M., Da Cunha, M., Soares, A. A.,

- Oliveira, J. T. A. (2005) A cotyledonary agglutinin from *Luteiza guianensis* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum dematium*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Plant Sci.* 169: 629-639.
- Miller, S. S., Bowman, L. A., Gijzen, M., Miki, B. L. A. (1999) Early development of the seed coat of soybean (*Glycine max*). *Ann. Bot.* 84: 297-304.
- Minor, H. C., Souza, B. H., Gonçalves, H. M. (1975) Caracterização botânica e fenológica dos cultivares do Banco de Germoplasma de soja. *Agroquímica* 11(2), 157-194.
- Mohammadi, M., Kazemi, H. (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Ustilago tritici* and induced resistance. *Plant Sci.* 162: 491-498.
- Moïse, J. A., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D. A., Mikica, B. L. A. (2005) Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. In vitro cellular and developmental biology. *Plant* 41: 620-644.
- Mookherjee, P. B., Chawla, M. L. (1964) Effect of temperature and humidity on the development of *Callosobruchus maculatus*. Fab. A serious pest of stored pulses. *Insect* 26(3): 345-351.
- Moraes, R. A., Sales, M. P., Pinto, M. S. P., Silva, L. B., Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (2000) Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Braz. J. Biol. Res.* 33: 191-198.
- Mota, A. C., Damatta R. A., Lima Filho, M., Silva, C. P., Xavier-Filho, J. (2003) Cowpea (*Cajanus cajan*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). *Insect Physiol.* 49(9): 873-880.
- Moura, F. T., Oliveira, A. S., Macedo, L. L., Vianna, A. L., Andrade, L. B., Martins-Miranda, A. S., Oliveira, J. T., Santos, E. A., Sales, M. P. (2007) Effects of a chitin-binding vicilin from *Phaseolus lunatus* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Acanthoscelus obtectus*) and

phytopathogenic fungi (USA and South America)

- Insect Physiol* 46: 393-402.
- Park, H. S. C., Van Etten, R. (1986) Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase. *Physiol Zool* 25: 351-357.
- Penheiter, A. R., Duff, S. M. G., Sarath, G. (1997) Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiol* 114: 597-604.
- Pernas, M., Sanchez-Monge, R., Salcedo, G. (2000) Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *Phytochem Lett* 467: 206-210.
- Plaxton, W. C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Ann. Rev. Plant Physiol Mol Biol* 47: 185-214.
- Purcell, J. P., Greenplate, J. T., Sammons, R. D. (1992) Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem Mol Biol* 22: 41-47.
- Reimers, P. J., Guo, A., Leach, J. E. (1992) Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol* 99: 1044-1050.
- Rhoades, D. F. (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. G. A. Rosenthal, D. H. Janzen (eds.). *In: The evolution of the interaction with secondary metabolites*. New York: Academic Press, p. 3-53.
- Rossi, A., Palma, M. S., Leone, F. A., Briigliador, M. A. (1981) Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds. *Physiol Zool* 20: 1823-1826.
- Ryan, C. A. (1991) Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann. Rev. Physiol* 28: 425- 449.
- Sales, M. P., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (1996) Chitin-binding proteins from cowpea (*Cajanus cajan*) seeds. *Braz. J. Biol. Res.* 29: 319-326.
- Sales, M. P., Macedo, M. L., Xavier-Filho, J. (1992) Digestibility of cowpea (*Cajanus cajan*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinases. *Comp.*

- Bac. em. Phys.* 103b(4): 945-950.
- Sales, M. P., Pimenta, P. P., Paes, N. S., Grossi-de-Sá, M. F., Xavier-Filho, J. (2001) Vicilins (7S storage globulins) of cowpea seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Braz. J. Biol. Res.* 34: 27-34.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vogeli-Lange, R., Aeschbacher, R. A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D. R., Boller, T. (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Phaseolus vulgaris* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Plant Physiol.* 126: 763-777.
- Santos, I. S., Da Cunha, M., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2004) A chitinase from *Phaseolus pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. *Plant Sci.* 167: 1203-1210.
- Santos, J. H. R., Teófilo, E. M., Almeida, J. M., Oliveira, F. J. (1977) Percentagens de sementes de cultivares de *Phaseolus* (L) Savi, atacadas pelo *Callosobruchus maculatus*. Fiedler, 1936 (Col: Curc.). Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Fitotecnia. Relatório de Pesquisa, Fortaleza. 70-74.
- Santos, P. O. (2004) Investigação da toxicidade do tegumento da semente de soja (*Glycine max*) para o gorgulho do feijão-de-corda (*Callosobruchus maculatus*) e fungos fitopatogênicos. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 82p.
- Selitrennikoff, C. P. (2001) Antifungal Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7): 2883-2894.
- Sessa, D. J., Wolf, W. J. (2001) Bowman-Birk inhibitors in soybean seed coats. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 73-83.
- Shewry, P. R., Lucas, J. A. (1997) Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 26: 135-192.
- Silva, L. B., Sales, M. P., Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S.,

- Xavier-Filho, J. (2004) The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)]. *An. B. az. Acad. Sc.* 76 (1): 57-65.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledone, M., Menachem, E., Levine, A. (1999) The involvement of cysteine proteinase and proteinase inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11: 431-443.
- Souza, F. H. D., Marcos-Filho, J. (2001) The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Rev. Bras. Bot.* 24 (4): 365-375.
- Staswick, P. E., Papa, C., Huang, J., Rhee, Y. (1994) Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed-pod removal. *Plant Physiol* 104: 49-57.
- Swanson, B. G., Hughes, J. S., Rasmussen, H. (1985) Seed microstructure: review of water imbibition in legumes. *Food Cosmet. Toxicol.* 23: 115-124.
- Swanson, M. C., Li, J. T., Wentz-Murtha, P. E., Trudeau, W. L., Fernandez-Caldas, E., Greife, A., Rodrigo, M. A. J., Morell, F., Reed, C. E. (1991) Source of the aeroallergen of soybean dust: a low molecular mass glycopeptide from the soybean testa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 783-788.
- Thiery, D. (1984) Hardness of some fabaceous seed coats in relation to larval penetration by *Callosobruchus maculatus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Stoeberia* 20 (4): 177-181.
- Towbin, H., Staehelin, N. T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 76: 4350-4354.
- Uchôa, A. F. (2006) Presença sistêmica de vicilinas de sementes de leguminosas nas larvas dos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Acanthoscelus obscurus*. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia). Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 122p.
- Uchôa, A. F., DaMatta, R. A., Retamal, C. A., Albuquerque-Cunha, J. M., Souza, S. M., Samuels, R. I., Silva, C. P., Xavier-Filho, J. (2006) Presence of the storage

- seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Insect Physiol.* 52: 169-178.
- Valueva, T. A., Mosolov, V. V. (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem. Mosc.* 69 (11): 1305-1309. Translated from *Biokhimiya*, 69 (11): 1600-1606.
- van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M. H., Wouterlood, M., van Aelst, A. C., Borstlap, A. C. (2003) Structure of the developing pea seed coat and the postphloem transport pathway of nutrients. *Ann. Bot.* 91: 729-737.
- Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J. (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Phytochemistry* 183: 258-262.
- Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A. (2004) Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicol.* 44: 385-403.
- Walker, A. J., Ford, L., Majerus, M. E. N., Geoghegan, A. E., Birch, N., Gatehouse, J. A., Gatehouse, A. M. R. (1998) Characterization of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia punctata*) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 173-180.
- Wang, H. L., Grusak, M. A. (2005) Structure and development of *Phaseolus vulgaris* pod wall and seed coat. *Ann. Bot.* 95: 737-747.
- Wang, S., Lin, J., Mingyu Ye, Ng, T. B., Rao, P., Ye, X. (2006) Isolation and characterization of a novel mung bean protease inhibitor with antipathogenic and anti-proliferative activities. *Peptides* 27: 3129-3136.
- Wang, S., Ng, T. B., Chen, T., Lin, D., Wu, J., Rao, P., Ye, X. (2005) First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 820-827.
- Wang, X., Bunkers, G. J., Walters, M. R., Thoma, R. S. (2001) Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Atriplex canescens*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (5): 1224-1228.

- Wang, X., Ding, X., Gopalakrishnan, B., Morgan, T. D., Johnson, L., White, F. F., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J. (1996) Characterisation of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26(10): 1055-1064.
- Welinder, K. G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 388-393.
- Welinder, K. G., Larsen, Y. B. (2004) Covalent structure of soybean seed coat peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 1698: 121-126.
- Wildon, D. C., Thain, J. F., Minchin, P. E. H., Gubb, I. R., Reilly, A. J., Skipper, Y. D., Doherty, H. M., Donnell, P. J., Bowles, D. J. (1992) Electrical signaling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Plant Cell* 4: 62-65.
- Williams, J. O. (1980) Note on bruchidae associated with stored products in Nigeria. *Trop. Grassl. Legume Bull.* 26: 5-10.
- Williams, L. F. (1950) Structure and genetic characteristics the soybean products. *Int. Science Publ.* 1: 111-134.
- Xavier-Filho, J. (1992) The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 4: 1-6.
- Xavier-Filho, J. (1993) Sementes e suas Defesas contra Insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. Organização dos Estados Americanos (OEA). Universidade Federal do Ceará: Imprensa Universitária. 1-9.
- Xavier-Filho, J., Campos, F. A. P., Ary, M. B., Silva, C. P., Carvalho, M. M. M., Macedo, M. L. R., Lemos, F. J. A., Grant, G. (1989) Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Cajanus cajan*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Agrochim. Bras.* 37: 1139-1145.
- Xavier-Filho, J., Coelho, A. N. (1980) Acid proteinases of *Callosobruchus maculatus* and proteinase inhibitors of *Cajanus cajan*. *Plant Physiol.* 65: 138.
- Xavier-Filho, J., Fernandes, K. V. S. (1998) The biological roles of legume seed vicilins (7S storage proteins). *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 4: 241-245.

- Ye, X. Y., Ng, T. B. (2002) Isolation of a novel peroxidase from French bean legumes and first demonstration of antifungal activity of a non-milk peroxidase. *L. Sc.* 71: 1667-1680.
- Ye, X.Y., Ng, T.B. (2005) A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Plant Exp. Pu.* 40: 230-236.
- Ye, X. Y, Ng, T. B., Rao, P. F. (2001) A Bowman-Birk type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 91-96.
- Ye, X. Y., Wang, H. X., Ng, T. B. (2000) Dolichin, a new chitinase-like antifungal protein isolated from field beans (*Dolichos b. b.*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 155-159.
- Young, S. A., Guo, A., Guikema, J. A., White, F. F., Leach, J. A. (1995) Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Physiol.* 107: 1333-1341.
- Yunes, A. N. A., Andrade, M. T., Sales, M. P., Morais, R. A., Fernandes, K. V. S., Gomes, V. M., Xavier-Filho, J. (1998) Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.)]. *Sci. Technol. Ag.* 76: 111-116.
- Zeng, C.-L.; Wang, J.-B.; Liu, A.-L.; Wu, X.-M. (2004) Seed coat microsculpturing changes during seed development in diploid and amphidiploid *Bassia* species. *Ann. Bot.* 93: 555-566.
- Zhu-Salzman, K., Bi, J. L., Liu, T-X. (2005) Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. *Insect Sci.* 12: 3-15.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)