

Universidade Católica de Brasília

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
STRICTO SENSO EM CIÊNCIAS GENÔMICAS E BIOTECNOLOGIA

Mestrado

**Expressão heteróloga de defensina de ervilha (*Pisum sativum*) em
Pichia pastoris e avaliação da atividade biológica contra fungos de
importância agronômica**

Autor: Ariane Ferreira Lacerda

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientador: Thales Lima Rocha

BRASÍLIA

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ariane Ferreira Lacerda

**Expressão heteróloga de defensina de ervilha (*Pisum sativum*) em
Pichia pastoris e avaliação da atividade biológica contra fungos de
importância agrônômica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “*Stricto Senso*” em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientador: Thales Lima Rocha

**Brasília
2009**

Dedico este trabalho aos meus pais. A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um simples agradecimento. Obrigado por fazerem seus os meus momentos difíceis, por estarem presentes mesmo que distantes. Obrigado por fazerem suas as minhas conquistas. Pela compreensão muitas vezes sofrida nas inúmeras despedidas, nas ausências quando era essencial estar presente. Obrigado por fazerem seus este momento e por darem a esta conquista um sentido ainda maior.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir e abençoar a execução deste trabalho. A quem nos momentos difíceis recorri e em quem me sustentei.

À Profª Dra **Maria de Fátima Grossi de Sá**, pela oportunidade concedida, confiança em meu trabalho e por todos os ensinamentos adquiridos durante esse período.

Ao meu co-orientador, amigo e “pai” **Thales Lima Rocha** pela amizade, pelo carinho, pela confiança e pela inestimável companhia durante todo este período. Pelas diversas vezes em que me deu colo e me mostrou que nem tudo estava perdido.

Ao Prof. Dr. **Maurício Pereira de Sales**, pela confiança e indicação ao Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I.

Ao Prof. Dr. **Octávio Luiz Franco**, pelo apoio e incentivo ao meu trabalho. Mesmo não tendo participação direta, contribuiu para a execução deste trabalho.

À Dra. **Cristina Mattar**, pelas sugestões e conselhos fornecidos durante a realização deste trabalho.

À Dra. **Marília Santos Silva**, pela amizade e auxílio nos ensaios contra os fungos.

Ao adorável amigo, orientador e irmão **Rafael Perseghini Del Sarto**, minha eterna gratidão pelos ensinamentos nas técnicas de laboratório, paciência, carinho e pela ajuda despendida em todos os momentos que precisei, não somente na área profissional, mas também na pessoal.

Aos meus tios **Débora e Fernando**, por tudo que fizeram por mim durante todo esse período, pela adorável companhia e pela inestimável ajuda quando cheguei a Brasília. Às minhas grandes paixões **Bia e Lucas**. Vocês tornam os meus dias mais alegres. Volto a ser criança e esqueço tudo quando estou perto de vocês.

À **Valéria**, pelo apoio incondicional. Hoje sou capaz de compreender a sua vinda para Brasília logo depois que cheguei. Obrigado por todos os momentos que passamos juntas. Sentirei muito a sua falta. Como você mesmo disse: Perdi uma cunhada, mas ganhei uma irmã.

À **Carol, Vanessa e Bebeta**, minhas amigas e companheiras de laboratório, e aos amigos **Léo, Ismail e Dja**. Não tenho palavras para expressar o quanto vocês foram importantes para mim. Sou privilegiada, ou melhor, abençoada por ter amigos como vocês. Obrigado por tudo, pelas horas descontraídas e felizes que passamos juntos. Bebeta não poderia deixar de agradecer a inestimável ajuda durante os experimentos de expressão. Obrigado pelos diversos finais de semana que abriu mão para me ajudar na expressão das proteínas.

À **Uziel** por ter me ensinado que podemos ser felizes mesmo nos momentos mais difíceis. “Agora eu sei que tudo estava escrito, enfim, pelas mãos de Deus”.

À **Érico** pelo apoio, conselhos, carinho e disposição com que sempre me ajudou. Pela imprescindível ajuda na purificação da proteína.

À **Lecir**, pela amizade e principalmente paciência, que por muitas vezes fiz você perder com os meus aperreios. Seu trabalho é essencial para o bom funcionamento do laboratório.

À **Sineide**, pelo carinho e atenção com que sempre se dispôs a me ajudar. Poucos reconhecem a importância do seu trabalho, mas sua ajuda é fundamental para a execução dos nossos experimentos no laboratório.

A todos do **Laboratório de Interação Molecular Planta–Praga I**, e a todas as amigadas que conquistei. Guardarei boas lembranças de cada um de vocês.

A **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, ao **CNPq** pelo apoio financeiro e à **Universidade Católica de Brasília**, que muito contribui para a minha formação profissional.

"Nada é tão difícil que, à força de tentativas, não tenha resolução".

(Terêncio)

RESUMO

Referência: Lacerda, Ariane. Título: Expressão heteróloga de defensina de ervilha (*Pisum sativum*) em *Pichia pastoris* e avaliação da atividade biológica contra fungos de importância agrônômica. 2009. 62 páginas. Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

A ocorrência de doenças fúngicas tem influenciado severamente a produtividade de culturas economicamente importantes no Brasil e no mundo. Dentre essas doenças, destacam-se as causadas pelos fungos *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines* e *Macrophomina phaseolina*, que geram perdas significativas no cultivo de soja e algodão no país. Atualmente, o controle desses fitopatógenos é bastante difícil e baseia-se principalmente no uso de fungicidas, os quais são caros, ineficazes e, sobretudo, prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Além disso, o número de cultivares resistentes disponíveis no mercado é limitado. As plantas apresentam um vasto repertório de moléculas relacionadas ao processo de defesa. Neste contexto, as defensinas vegetais com massa molecular de ~5 kDa, básicas e ricas em cisteínas, desempenham um importante papel devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiana. Por esta razão, estes peptídeos têm-se mostrado como uma alternativa viável e promissora, podendo ser utilizados na agricultura para o desenvolvimento de transgênicos resistentes ao ataque de patógenos. O presente trabalho teve por finalidade a expressão do gene de defenina de ervilha (*Pisum sativum*) *drr230a* na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, assim como a purificação e a avaliação da atividade biológica da proteína recombinante contra fungos de importância agrônômica para culturas de soja e algodão. Para alcançar este objetivo, o gene foi amplificado via PCR e subclonado no plasmídeo pPICZ α A para expressão em *P. pastoris*. Após a análise dos transformantes, clones foram selecionados e analisados via Western blotting, com o uso do anticorpo monoclonal Anti-6xHis. As proteínas secretadas no meio de cultura foram purificadas e utilizadas em ensaios de inibição de crescimento micelial dos fungos acima citados. De acordo com os resultados obtidos, a expressão da rDRR230a foi detectada depois de 24 h, mantendo-se constante até 96 h após a indução. O rendimento da defensina Drr230a foi de aproximadamente 3,5 mg por litro de meio de cultura. Bioensaios utilizando proteínas totais secretadas ou 3 μ g/ μ L de rDrr230a purificada revelaram que o crescimento micelial dos fungos foi reduzido em comparação ao controle negativo. Os resultados deste trabalho confirmam a eficiência do sistema de expressão heteróloga usando *P. pastoris* e abrem novas perspectivas para a utilização da defensina Drr230a na geração de plantas de soja e algodão geneticamente modificadas resistentes a esses fitopatógenos.

Palavras chaves: Defensina vegetal, *Pisum sativum*, expressão heteróloga, *Pichia pastoris*, bioensaios, fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

The production of economically important crops in Brazil and worldwide has been severely limited in recent years by the occurrence of diseases caused by fungi. Those of particular importance are *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Fusarium solani* f.sp. *glycines* and *Macrophomina phaseolina* that can generate significant losses in soybean and cotton cultivation. Currently, the control of these phytopathogens is difficult, and is mainly based on the use of fungicides, which are not only expensive and ineffective, but are also harmful to human health and the environment. A preferred control strategy would be the cultivation of pathogen-resistant cultivars, but the number available in the market is quite restricted. In nature plants exhibit a vast repertoire of defense processes. In this context, defensins (basic and cysteine-rich peptides of ~5 kDa) play an important role in defense against diverse plant pathogens due to their broad range activity. For this reason, these peptides are promising biotechnological candidates for pathogen control. The present work is directed toward the expression of the pea (*Pisum sativum*) *drr230a* defensin gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as well as the purification and evaluation of the biological activity of the recombinant protein against fungi of agronomical relevance to soybean and cotton culture. To achieve these goals, the *drr230a* gene was amplified by PCR and subcloned into pPICZ α A for expression in *P. pastoris*. After analysis of transformants, clones were selected and analyzed by Western blotting using the monoclonal antibody Anti-6xHis. The secreted proteins in the culture medium were purified and used in inhibition assays of fungi mycelial growth. The expression of secreted recombinant Drr230a was detected after 24 h, remaining constant until 96 h of induction. The yield of defensin Drr230a was approximately 3.5 mg per liter of culture medium. Bioassays using total secreted proteins or 3 μ g/ μ L purified rDrr230a revealed that mycelial growth was reduced in comparison to negative controls. These results confirm the efficiency of the heterologous expression system using *P. pastoris* and open up perspectives for Drr230a defensin use in the generation of transgenic resistant soybean and cotton plants against phytopathogens.

Key-words: defensin, *Pisum sativum*, heterologous expression, *Pichia pastoris*, bioassays, phytopathogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional de defensinas de planta, invertebrados (insetos e moluscos) e de vertebrados (mamíferos)	19
Figura 2: Mapa da construção do vetor pPICZ α A/drr230a para expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	31
Figura 3: Análise da digestão do plasmídeo pGEM-T-Easy/drr230a com a enzima de restrição <i>EcoRI</i>	36
Figura 4: Análise da digestão do plasmídeo pPICZ α A/drr230a com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i>	37
Figura 5: Seleção dos clones Zeocina resistentes para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	38
Figura 6: Curva de crescimento dos clones de <i>Pichia pastoris</i> expressando Drr230a.....	38
Figura 7: Análise por SDS-PAGE e Western blot da expressão de rDrr230a em <i>Pichia pastoris</i>	39
Figura 8: Análise por SDS-TRICINE-PAGE e Western blot da purificação de rDrr230a expressa em <i>P. pastoris</i>	40
Figura 9: Atividade antifúngica da defensina rDrr230a após 48 e 96 horas de expressão	41
Figura 10: Atividade antifúngica da defensina rDrr230a purificada contra <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i> e área de inibição do crescimento micelial em tampões com diferentes pH.....	42
Figura 11: Atividade antifúngica da defensina rDrr230a purificada contra <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Defensinas de plantas e seu amplo espectro de atividade.....	21
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene <i>drr230a</i> para subclonagem no plasmídeo pPICZ α A.....	30
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do gene de defensina de ervilha (<i>drr230a</i>) subclonado no plasmídeo pPICZ α A e para análise dos transformantes por PCR de colônia	31
Tabela 4: Concentração de proteína total secretada (ng/ μ L) após expressão em <i>Pichia pastoris</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS

- PIB** - Produto Interno Bruto
- CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento
- AMPs** - Peptídeos antimicrobianos
- Rs-AFP1** - Defensina de rabanete
- Ra-AFP1** - Defensina de rabanete
- ROS** - Espécies reativas de oxigênio
- MiAMP1** - Peptídeo antimicrobiano de *Macadamia integrifolia*
- Ib-AMP1** - Peptídeo antimicrobiano de *Impatiens balsamina*
- IMAC** - Cromatografia de afinidade com metal imobilizado com níquel
- PR** - Proteínas relacionadas à patogênese (*Pathogenesis related protein*)
- PRG** - Proteínas ricas em glicina (*Glycine-rich proteins*)
- PIRs** - Proteínas ricas em ribossomos (*Ribosome-inactivating-proteins*)
- LTPs** - Proteínas transferidoras de lipídeos (*Lipid-transfer proteins*)
- PDB** – Banco de dados de proteínas
- PsD1** - Defensina de ervilha (*Pisum sativum*)
- Phd1** – Defensina de *Petúnia híbrida*
- NaD1** - Defensina de *Nicotiana glauca*
- Vrd1** - Defensina de *Vigna radiata*
- Alf-AFP** - Defensina de *Medicago sativa*
- Dm-AMP1** - Defensina de *Dahlia merckii*
- Dm-AMP2** - Defensina de *Dahlia merckii*
- Ah-AMP1** - Defensina de *Aesculus hippocastanum*
- So-D1-7** - Defensina de *Spinacea oleracea*
- Ac-AMP1** - Defensina de *Amaranthus caudatus*
- Ac-AMP2** - Defensina de *Amaranthus caudatus*
- Pth- St1** - Defensina de *Solanum tuberosum*
- SI α 1** - Defensina de *Sorghum bicolor*
- SI α 2** - Defensina de *Sorghum bicolor*
- SI α 3** - Defensina de *Sorghum bicolor*
- BI α 1** – Defensina de *Hordeum vulgare*
- BI α 2** – Defensina de *Hordeum vulgare*

CfD2 - Defensina de *Cássia fistula*

CP – tionina - Defensina de *Vigna unguiculata*

γ 1-Z - Defensina de *Zea mays*

γ 2-Z - Defensina de *Zea mays*

Dr230a - Defensina de *Pisum sativum*

rD230a – Defensina recombinante de *Pisum sativum* expressa em *Pichia pastoris*

Hs-AFP1 - Defensina de *Heuchera sanguinea*

Ct-AMP1 - Defensina de *Clitoria ternatea*

GlcCer - Glicosilceramidas

AOX1 - Álcool oxidase 1

AOX2 - Álcool oxidase 2

AX2 - Defensina de beterraba

PpDfn1 - Defensina de *Prunus persica*

SPE10 - Defensina de *Achyrrhizus erosus*

Glu – Glutamato

Ala – Alanina

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

O.D – Densidade óptica

LB - Meio de cultura Luria Bertani

YPD - Meio de cultura para levedura (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*)

YNB - Base nitrogenada de levedura (*Yeast Nitrogen Base*)

BMM - Meio mínimo tamponado (*Buffered Minimal Methanol*)

TBS - Tampão tris salino

BSA - Soro Albumina Bovina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Peptídeos antimicrobianos	16
1.2 Peptídeos antimicrobianos vegetais	177
1.3 Defensinas Vegetais	18
1.4 O uso de defensinas vegetais na produção de plantas transgênicas	23
1.5 Expressão de proteínas recombinantes em sistema heterólogo	24
1.5.1 Produção de proteínas heterólogas utilizando <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão	24
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Subclonagem do gene <i>drr230a</i> , no plasmídeo pPIZCaA.....	29
3.2 Seleção dos transformantes por ensaio de resistência a Zeocina e expressão de Drr230a em <i>Pichia pastoris</i>	32
3.3 Detecção das proteínas recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>SDS-TRICINE-PAGE</i>) e Western blot	33
3.4 Purificação das proteínas recombinantes expressas em <i>Pichia pastoris</i>	34
3.5 Bioensaios	34
3.5.1 Análise da atividade antifúngica da defensina recombinante Drr230a	34
4. RESULTADOS	36
4.1 Subclonagem do gene <i>drr230a</i> , no plasmídeo pPIZCaA.....	36
4.2 Seleção dos transformantes por ensaio de resistência a Zeocina e expressão de Drr230a em <i>Pichia pastoris</i>	37
4.3 Análise das proteínas recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>SDS-TRICINE-PAGE</i>) e Western blot	39
4.4 Purificação das proteínas recombinantes expressas em <i>Pichia pastoris</i>	40
4.5 Bioensaios	41
4.5.1 Análise da atividade biológica da defensina recombinante Drr230a	41

5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	50
7. PERSPECTIVAS	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira é um dos setores que mais contribuem para o desenvolvimento econômico do país. A grande participação do complexo agroindustrial no Produto Interno Bruto (PIB) e o alto valor dos produtos de origem agrícola na pauta de exportações são exemplos da sua importância para o desempenho da economia brasileira.

No contexto internacional, o Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários. Como exemplo, o país ocupa o segundo lugar na produção de soja, sendo o principal exportador dessa *commodity*. Além disso, é o maior produtor e exportador de café e cana-de-açúcar e, conseqüentemente destaca-se como um dos mais importantes produtores de açúcar e álcool. É o quinto produtor mundial de algodão, e está entre os dez principais produtores de arroz (Brasil, disponível em <http://www.agricultura.gov.br>).

Nos últimos anos, a ocorrência de insetos-pragas e doenças em plantas agronomicamente importantes tem gerado grandes perdas econômicas no Brasil e no mundo. Dentre as doenças de plantas, as fúngicas são as mais relevantes, causando sérios danos à agricultura. Neste contexto, destacam-se as ocasionadas pelo ataque dos fungos, causadores da ramulose do algodoeiro (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), podridão vermelha da raiz de soja (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) e podridão de carvão da soja (*Macrophomina phaseolina*). Estas duas últimas são doenças amplamente difundidas no Brasil, que causam danos econômicos representativos ao cultivo da soja (ALMEIDA *et al.*, 2003; MENGISTU e PARIS, 2003; FREITAS *et al.*, 2004). Nestes casos, não existem cultivares comerciais resistentes ou métodos de controle químico ou culturais eficientes (FRONZA, 2003; GÁSPERI *et al.*, 2003).

A ramulose é considerada uma das doenças mais destrutivas do algodoeiro no Brasil, e encontra-se disseminada em praticamente todo o país, causando sérios problemas nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e em algumas localidades do Nordeste (IAMAMOTO, 2003). Essa doença causa perdas significativas na produtividade, podendo gerar prejuízos de até 75%, dependendo das condições climáticas, das variedades utilizadas e do número de aplicações de fungicidas (CASSETARI NETO *et al.*, 2001; IAMAMOTO *et al.*, 2001).

Diversas alternativas de controle têm sido utilizadas visando a redução dos danos causados pelo ataque de doenças. O controle por meio da resistência genética é uma forma eficaz e econômica; no entanto, para um grande número de doenças, cultivares resistentes são limitados (EMBRAPA, 2006). Desta forma, o uso de fungicidas químicos é o método de controle comumente utilizado entre os produtores. Apesar da eficácia para o controle de algumas doenças, o uso de fungicidas eleva os custos de produção e apresenta riscos à saúde dos agricultores e também ao meio ambiente. Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), os agrotóxicos representam, na composição dos custos de produção para a região Centro-Sul, cerca de 25,4 % para o algodão, 10,4 % para o arroz, 10,9 % para o milho, 19,2 % para a soja e 15,7 % para o trigo (CONAB, 2006).

Diante disso, fica evidente a necessidade da busca por alternativas menos danosas, mais eficientes e econômicas para o controle desses fitopatógenos. Assim, o uso de peptídeos antimicrobianos constitui-se numa alternativa viável, e tem sido amplamente utilizado na agricultura para a modificação e o desenvolvimento de plantas resistentes ao ataque de patógenos (KOO *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2007; KOVALSKAYA e HAMMOND, 2009)

1.1 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) constituem um importante componente do sistema imune de muitas espécies, representando sua primeira linha de defesa. Essas moléculas ocorrem em uma grande variedade de organismos, incluindo vertebrados e invertebrados, plantas, bactérias e fungos (REDDY *et al.*, 2004).

Centenas desses peptídeos já foram isolados e caracterizados, entre estes estão incluídos α e β -defensinas humanas (ZASLOFF, 2002), defensinas vegetais Rs-AFP1 e Rs-AFP2 de rabanete (DE SAMBLANX *et al.*, 1997), cecropina de insetos (STEINER *et al.*, 1981), mangainina da epiderme de *Xenopus* (ZASLOFF, 1987) e androctonina de escorpião (MANDARD *et al.*, 1999).

Os AMPs são moléculas relativamente pequenas (~10 kDa), catiônicas e anfipáticas. Apresentam alto potencial antimicrobiano, sendo ativos contra diversos microorganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas,

protozoários, leveduras, fungos e vírus. (REDDY *et al.*, 2004). A expressão desses peptídeos pode ser constitutiva ou induzida pelo contato com o patógeno.

Além disso, os AMPs são produzidos a partir do estímulo dos microorganismos comensais que também atuam protegendo o hospedeiro por competirem com os microorganismos patogênicos (BOMAN, 2000).

Aproximadamente 900 AMPs já foram identificados (MONTESINOS, 2007), sendo classificados em peptídeos lineares formando estruturas em hélice, peptídeos ricos em cisteína, ligadas por pontes dissulfeto, e ciclopeptídeos formando um peptídeo circular. Essas moléculas lineares e cíclicas podem ter ácidos graxos ou outros compostos ligados às suas cadeias, resultando em moléculas complexas, os pseudopeptídeos (MONTESINOS, 2007)

Os mecanismos de ação dos AMPs são variados, podendo atuar na formação de poros ou canais na membrana, na inibição da síntese de proteínas e na degradação de proteínas envolvidas na replicação do DNA, entre outras (REDDY *et al.*, 2004; IZADPANA e GALLO, 2005). Todavia, algumas dessas moléculas não apresentam mecanismos de ação conhecido, sendo necessários estudos mais detalhados para a elucidação do seu modo de ação.

1.2 Peptídeos antimicrobianos vegetais

As plantas são constantemente desafiadas pelo ataque de patógenos e insetos-praga, além de serem expostas a diversas variações ambientais, como temperatura, salinidade e umidade. Em resposta a isso, estas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, sofisticados mecanismos de defesa (MURAD, 2007; TAVARES *et al.*, 2008).

Os sistemas de defesa podem atuar de duas formas, constitutiva, durante o desenvolvimento e, induzida quando em contato com o patógeno. O sistema induzido envolve a contenção física da infecção por intermédio da resposta hipersensitiva, caracterizado pela morte celular programada (*apoptose-like*) (TAVARES *et al.*, 2008), ou então com o fortalecimento das barreiras físicas (HEIL e BOSTOCK, 2002)

Adicionalmente a esses eventos, as plantas sintetizam espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio, que atuam como antimicrobianos. As plantas também produzem fitohormônios, como o

ácido salicílico e o ácido jasmônico, que atuam como sinalizadores e indutores da expressão de proteínas relacionados à patogenicidade (Proteínas PR). Além disso, é bastante comum o acúmulo de metabólitos secundários de baixa massa molecular, como as fitoalexinas, taninos e compostos fenólicos (SELS *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2008).

Dentre os AMPs e/ou proteínas envolvidas com a resistência de plantas, destacam-se: peptídeos tipo heveína (BROEKAERT *et al.*, 1992), tipo knotina (CAMMUE *et al.*, 1992; SEGURA *et al.*, 1993), MiAMP1, de *Macadamia integrifolia* (MARCUS *et al.*, 1997; MCMANUS *et al.*, 1999), Ib-AMP1, de *Impatiens balsamina* (TAILOR *et al.*, 1997; PATEL *et al.*, 1998), ciclotídeos (JENNINGS *et al.*, 2001), esnaquina-2 de batata (BERROCAL-LOBO *et al.*, 2002), proteínas PR-1, (1,3) β -glucanases, quitinases, proteínas de ligação à quitina, proteínas semelhantes a taumatinas, proteínas semelhantes a ciclofilinas, proteínas ricas em glicina (PRG), proteínas ricas em ribossomos (PIRs), proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs), proteínas “Killer” (*Killer toxins*), inibidores de enzimas, defensinas e outras proteínas (SELITRENNIKOFF, 2001).

1.3 Defensinas Vegetais

As defensinas, encontradas em diversos organismos, como mamíferos, insetos e plantas, são importantes componentes relacionados ao sistema de defesa, possuindo atividade contra vários patógenos, incluindo fungos e bactérias (BROEKAERT *et al.*, 1997; MURAD, 2007). Estas moléculas compõem o sistema de defesa vegetal de monocotiledôneas e dicotiledôneas (CHAN *et al.*, 2005). Além disso, são importantes fatores que integram a resposta vegetal a estresses bióticos ou abióticos (BROEKAERT *et al.*, 1994; TERRAS *et al.*, 1995; VAN LOON, 1997), podendo ser produzidas durante o desenvolvimento da planta, de maneira constitutiva, ou induzida, após contato com o microorganismo invasor.

As defensinas são expressas em diversas partes da planta, incluindo folhas jovens e maduras (GU *et al.*, 1992; MORENO *et al.*, 1994; TERRAS *et al.*, 1995; WISNIEWSKI *et al.*, 2003), raiz (MORENO *et al.*, 1994; SHARMA e LONNEBORG, 1996) radículas e parte aérea de plântulas, inflorescência (LAY *et al.*, 2003a) e sementes (BROEKAERT, *et al.*, 1997; THOMMA *et al.*, 2002).

Em relação às características físico-químicas, estas moléculas são proteínas pequenas, com massa molecular de ~ 5 KDa, catiônicas, contendo de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, ricas em cisteínas, sendo bastante estáveis a variações de temperatura e pH (TERRAS *et al.*, 1995; BROEKAERT *et al.*, 1997; SELITRENNIKOFF, 2001; THOMMA *et al.*, 2002). A sequência primária dessas proteínas não é conservada entre diferentes espécies, restringindo-se somente a alguns resíduos de aminoácidos. No entanto, suas estruturas tridimensionais são bastante similares, sendo caracterizadas por folha β antiparalela tripla e uma α -hélice, conectando a fita β_1 a β_2 (BLOCH *et al.*, 1998; ROMAGNOLI *et al.*, 2003). Essa estrutura tridimensional é estabilizada por um motivo típico, denominado *cysteine-stabilized α -helix*, que consiste em duas pontes dissulfeto formadas entre duas cisteínas da α -hélice com duas cisteínas do C-terminal da folha β . O segmento CXXXC da α -hélice se conecta por meio de duas pontes dissulfeto ao segmento CXC da fita β_3 . Existe, ainda, uma terceira ponte dissulfeto no motivo CS α β e, por fim, duas cisteínas, presentes na extremidade do motivo, formam a quarta ponte dissulfeto (KOBAYASHI *et al.*, 1991). Esse padrão estrutural também é observado em defensinas de vertebrados e invertebrados (figura 1).

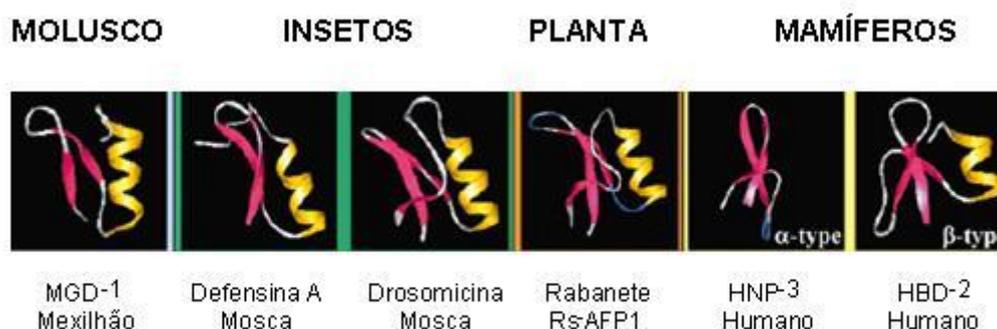


Figura 1: Estrutura tridimensional de defensinas de planta, invertebrados (insetos e moluscos) e de vertebrados (mamíferos). As estruturas foram retiradas do banco de dados de proteínas (<http://www.rcsb.org/pdb>). Números de acesso para o PDB: MDG1: 1FJN; defensina A: 1ICA; drosomicina: 1MYN; Rs-AFP1: 1AYJ; HNP-3: 1DFN, HBD-2: 1FD3. Alfa-hélices e folhas beta são mostradas em amarelo e vermelho, respectivamente. Modificado de (THOMMA, *et al.*, 2002).

A estrutura tridimensional de algumas defensinas vegetais foi elucidada por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Dentre elas, pode-se citar: *Psd1*, de *Pisum sativum* (ALMEIDA *et al.*, 2002); *Rs-AFP1*, de *Raphanus sativus* (FANT *et al.*, 1998); γ 1-hordotionina (g1-H) de cevada e γ 1-purotionina (g1-P), de endosperma de trigo (BRUIX *et al.*, 1993); *Phd1*, de *Petúnia híbrida* (JANSSEN *et al.*, 2003); *Nad1*, de *Nicotiana alata* (LAY *et al.*, 2003b); e *Vrd1*, de *Vigna radiata* (LIU *et al.*, 2006).

A aplicação de modelos teóricos também tem sido utilizada para a predição da estrutura tridimensional dessas moléculas. MELO *et al.*, (2002) propuseram por meio de modelagem molecular, a estrutura tridimensional da defensina isolada de sementes de feijão de corda (CP-tionina I), capaz de inibir a atividade de tripsina. Posteriormente, FRANCO *et al.*,(2006) também propuseram para a defensina CP-tionina II, responsável pela inibição do crescimento de bactérias patogênicas ao homem, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*,

A família das defensinas vegetais possui atividade biológica bastante diversificada. Várias dessas ações já foram descritas, como o impedimento do crescimento de fungos, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, a inibição da atividade de enzimas hidrolíticas, como α -amilases e a síntese de proteínas, e o bloqueio da atividade de serino proteases e canais de sódio. Ainda podem atuar como bloqueadores de ciclinas, envolvidas no ciclo celular, dentre outras (Tabela 1).

Embora as defensinas apresentem um amplo espectro de atividade, observa-se um maior número destas moléculas ativas contra fungos. Provavelmente, isso ocorre devido à maior quantidade de estudos realizados nesta área de pesquisa. Geralmente elas são ativas contra mais de uma espécie.

Dentre as diversas defensinas estudadas, as de rabanete, *Rs-AFP 1* e *2*, foram ativas contra os fungos *Cercospora beticola*, *Phoma betae*, *Pyricularia oryza* (TERRAS *et al.*, 1992). OSBORN *et al.*,(1995) demonstraram que as defensinas *Ah-AMPI*, *Ct-AMP1*, *Dm-AMPI*, *Dm-AMP2* e *Hs-AFP1* foram efetivas contra os fungos *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium culmorum*, *Leptosphaeria maculans*, *Penicillium digitatum*, *Septoria tritiei* e *Verticillium albo-atrum*. As defensinas purificadas de tabaco e petúnia, *NaD1* e *PhD1*, inibiram o

desenvolvimento dos fungos *F.oxysporum f. sp. Dianthi* e *B. cinerea* (LAY *et al.*, 2003a) e a de Alf-AFP inibiu o fungo *Verticillium dahliae* (GAO *et al.*, 2000).

Tabela 1: Defensinas de plantas e seu amplo espectro de atividade.

Atividade	Nome	Origem	Referência
Antifúngica	Rs-AFP1 e Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i>	(TERRAS, <i>et al.</i> , 1995)
	Alf-AFP	<i>Medicago sativa</i>	(GAO <i>et al.</i> , 2000)
	Dm-AMP1	<i>Dahlia merckii</i>	(OSBORN <i>et al.</i> , 1995)
	Ah-AMP1	<i>Aesculus hippocastanum</i>	(OSBORN, <i>et al.</i> , 1995)
Antibacteriana	So-D1-7	<i>Spinacia oleracea</i>	(SEGURA <i>et al.</i> , 1998)
	Ac-AMP1 e Ac-AMP 2	<i>Amaranthus caudatus L</i>	(BROEKAERT, <i>et al.</i> , 1992)
	Pth-St1	<i>Solanum tuberosum</i>	(MORENO <i>et al.</i> , 1994)
Inibidor de α -amilase	Sl α 1, Sl α 2 e Sl α 3	<i>Sorghum bicolor</i>	(BLOCH e RICHARDSON, 1991)
	Bl α 1 e Bl α 2	<i>Hordeum vulgare</i>	(BLOCH e RICHARDSON, 1991)
	VrD1	<i>Vigna radiata</i>	(LIU <i>et al.</i> , 2006)
	VuD1	<i>Vigna unguiculata</i>	(PELEGRINI <i>et al.</i> , 2008)
Inibidor de serino proteases	CfD2	<i>Cassia fistula</i>	(WIJAYA <i>et al.</i> , 2000)
	CP-tionina	<i>Vigna unguiculata</i>	(MELO <i>et al.</i> , 2002)
Bloqueador de canais de sódio	γ 1-Z e γ 2-Z	<i>Zea mays</i>	(KUSHMERICK <i>et al.</i> , 1998)
Bloqueador de Ciclina	PSD1	<i>Pisum sativum</i>	LOBO <i>et al.</i> , 2007)
Tolerância a Zinco (Zn)	AhPDF	<i>Arabidopsis halleri</i>	MIROUZE <i>et al.</i> , 2006
Inibidor de transcriptase reversa do vírus HIV	RBAFP	<i>Adzuchia angularis</i>	YE e NG, 2001
	RBAFP	<i>Delandia unbellata</i>	YE e NG, 2002

Apesar da ocorrência de muitos relatos na literatura sobre a atividade de defensinas de plantas, o mecanismo de ação dessas moléculas ainda não é bem conhecido. Defensinas isoladas de *R. sativus* e *D. merckii* induzem uma variedade de respostas na membrana fúngica (FERKET *et al.*, 2003). Algumas alterações, como permeabilização, alcalinização e mudanças no potencial da membrana,

sugerem que essas moléculas interagem com a membrana fúngica (THEVISSSEN *et al.*, 1996; THEVISSSEN *et al.*, 1999).

Estudos recentes têm demonstrado que defensinas antifúngicas interagem com glicosilceramidas (GlcCer), presentes na membrana do fungo. Isso foi demonstrado por THEVISSSEN *et al.*, (2004), que exibiram a atividade da defensina RsAFP 2 de *Raphanus sativus* contra *P. pastoris* e *Candida albicans*. Quando os fungos foram mutados, reduzindo o conteúdo de GlcCer em suas membranas, eles tornaram-se resistentes à ação da defensina, o que sugere a interação com (GlcCer). Além disso, ensaios contra *Sacharomyces cerevisiae* e *Shizosaccharomyces pombe* mostraram que os fungos foram resistentes à ação desta defensina, confirmando que a resistência está relacionado à ausência de proteínas necessárias para a síntese de GlcCer.

Embora seja importante para a atividade da defensina, a interação com GlcCer não é suficiente para provocar dano à membrana e consequente morte celular, sugerindo que outros alvos podem estar envolvidos na inibição do crescimento de fungos (THEVISSSEN *et al.*, 2004). Tal fato foi demonstrado quando a substituição de uma tirosina por uma glicina na posição 38 ocasionou a perda da atividade da RsAFP 2. A defensina mutante foi capaz de interagir com GlcCer, porém não provocou a permeabilização da membrana.

Outros estudos têm demonstrado que defensinas vegetais induzem o influxo de Ca^{2+} e o efluxo de K^+ , levando à morte celular, como ocorreu com as defensinas Rs-AFP2 e Dm-AMP1, de *Dalia merki*, quando testadas contra *N. crassa* (THEVISSSEN, *et al.*, 1996; THEVISSSEN, *et al.*, 1999). No entanto, para a maioria das defensinas vegetais, o modo de ação permanece indeterminado. Os componentes moleculares envolvidos na sinalização e possíveis alvos intracelulares continuam desconhecidos.

Entretanto, LOBO *et al.*, (2007) investigaram os mecanismos de ação intracelulares da defensina Psd1. Para isso, utilizaram o sistema duplo-híbrido em levedura para identificar a interação direta proteína-proteína entre o peptídeo Psd1 e as proteínas fúngicas. O sistema consistiu da utilização desta defensina como isca, e de produtos da expressão de uma biblioteca de cDNA de *N. crassa* como possível alvo. Neste estudo, foi possível demonstrar a interação da defensina com uma proteína intracelular envolvida na regulação do ciclo celular do fungo *N. crassa*. Com

isso, sugere-se que a defensina regule a migração nuclear pelo bloqueio da ação da ciclina F na fase de transição da fase S para a fase G2 do ciclo celular. Van Der Weerden *et al.*, (2008) propuseram o mecanismo de ação da defensina NaD1 contra o fungo *Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum*. Esse peptídeo parece ligar-se à parede celular da hifa, levando a uma rápida permeabilização da membrana plasmática do fungo, permitindo a entrada do peptídeo nas células da hifa. Isso leva à granulação do citoplasma e, conseqüentemente, à morte celular. Ainda não foi determinado se a morte celular ocorre devido à ligação na membrana ou à interação da defensina com alvos intracelulares. Entretanto, a produção de espécies reativas de oxigênio sugere que as células estão em processo de apoptose, uma vez que o acúmulo de ROS pode causar dano à membrana, causando a ruptura da organela.

1.4 O uso de defensinas vegetais na produção de plantas transgênicas

Há na literatura diversos relatos de plantas transgênicas que expressam peptídeos antimicrobianos vegetais (KOO *et al.*, 2002; MIROUZE *et al.*, 2006; ANURADHA *et al.*, 2008; KOVALSKAYA e HAMMOND, 2009). Nesse contexto, as defensinas vegetais têm sido exploradas na produção de plantas geneticamente modificadas, principalmente devido ao seu amplo espectro de ação, podendo atuar contra bactérias, fungos, insetos, dentre outros. Na década de 90, iniciaram-se os primeiros estudos com defensinas de plantas. EPLLE *et al.*, (1997) mostraram que a defensina Thi2.7 de *Arabidopsis thaliana*, quando expressa constitutivamente, foi capaz de aumentar a resistência de plantas susceptíveis ao ataque de *F.oxysporum f.sp. Matthiolae*. Posteriormente, a mesma defensina foi utilizada para produzir plantas transgênicas de tomate (*Solanum lycopersicum*). A defensina conferiu resistência ao fungo *F. oxysporum f. sp. Lycopersici*, bem como à bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* (CHAN *et al.*, 2005).

Outras defensinas têm sido utilizadas em programas de transgenia. A expressão da defensina alfAFP, de *Medicago sativa* (alfafa), em batata transgênica aumentou a resistência ao fungo patogênico *Verticillium dahliae*, o qual provoca perdas agrônômicas significativas. O nível de infecção pelo fungo foi reduzido em seis vezes, quando comparado às plantas não transformadas. Esta resistência foi mantida tanto em casa de vegetação quanto em condições de campo, em diferentes

localizações geográficas (GAO *et al.*, 2000). A defensina Drr230a, isolada de *P. sativum* (ervilha), foi capaz de conferir resistência à doença denominada canela-preta, causada pelo fungo *Leptosphaeria maculans*. Similarmente, WANG *et al.*, (2001) constataram que a mesma defensina reduziu a mortalidade de plantas infectadas com o fungo biotrófico *Rhizoctonia solani*. Neste mesmo trabalho, folhas inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* apresentaram lesões menores, 48 horas após a inoculação, levando ao retardo do desenvolvimento da doença.

Em 2002, o mesmo peptídeo foi utilizado para demonstrar que o extrato de tabaco transgênico contendo esta molécula foi capaz de reduzir o crescimento de vários fungos fitopatogênicos, entre os quais *Fusarium oxysporum*, *Ascochyta pinodes*, *Trichoderma reesei*, *Ascochyta lentis*, *F. solani*, *Leptosphaeria maculans*, *A. pisi* e *Alternaria alternata* (LAI *et al.*, 2002)

Estudos recentes com a defensina Dm-AMP1 mostraram que esta foi capaz de aumentar a resistência contra *Phytophthora palmivora* quando expressa em mamão (*Carica papaya* L.). Esta mesma defensina, quando expressa em plantas de arroz (*Oryza sativa* L. sp. indica cv. Pusa basmati 1), conferiu resistência também ao ataque dos fungos *Magnaporthe oryzae* e *R. solani*, que são dois dos mais importantes patógenos dessa planta, causando grandes perdas na produtividade. O nível de expressão de Dm-AMP1 foi entre 0,43% e 0,57% do total de proteínas solúveis, sendo capaz de reduzir o crescimento de *M. oryzae* e *R. solani* em 84% e 72%, respectivamente (ZHU *et al.*, 2007). Outra defensina, isolada de mostarda, quando expressa em tabaco e amendoim transgênico, conferiu resistência contra os fungos *Fusarium moniliforme*, *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae*, *Pheoisariopsis personata* e *Cercospora arachidicola* (ANURADHA *et al.*, 2008).

Diante dessas evidências, fica claro que as defensinas de plantas, além de participarem do mecanismo de defesa do seu organismo de origem, também podem ter atividade inibitória contra vários patógenos, podendo ser utilizadas no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas.

1.5 Expressão de proteínas recombinantes em sistema heterólogo

1.5.1 Produção de proteínas heterólogas utilizando *P. pastoris* como sistema de expressão

A expressão heteróloga de proteínas recombinantes possui uma grande aplicabilidade, tanto biotecnológica quanto medicinal. Nos últimos anos, o número de proteínas recombinantes utilizadas para estes fins tem aumentado consideravelmente, com grande demanda no mercado (JANA e DEB, 2005).

Diversos são os sistemas de expressão utilizados, incluindo *Escherichia coli*, Baculovírus, *S. cerevisiae*, células de mamíferos, *Schizosaccharomyces pombe* e *P. pastoris*. Dentre esses, *P. pastoris* tem-se mostrado um sistema altamente eficaz na produção de várias proteínas heterólogas.

O uso desse sistema de expressão tem crescido muito nos últimos anos. Isso pode ser atribuído a diversos fatores, como a simplicidade das técnicas utilizadas para a manipulação genética (alta frequência de transformação de DNA, clonagem por complementação funcional) e sua similaridade com *S. cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais caracterizados na biologia moderna. Outras características marcantes são a habilidade desta levedura em produzir proteínas em altos níveis, tanto intracelulares quanto extracelulares; a capacidade de executar modificações pós traducionais, tais como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e o processamento proteolítico; e, ainda, a disponibilidade deste sistema no mercado na forma de kit comercial (CEREGHINO e CREGG, 2000). Em virtude dessas características, algumas proteínas como, por exemplo, proteína G acoplada a receptores que não são expressas eficientemente em bactérias *S. cerevisiae* ou em baculovírus têm sido expressas eficientemente na sua forma ativa em *P. pastoris* (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

A levedura *P. pastoris* é um organismo metilotrófico capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono em seu meio de crescimento. Essa característica está sob controle de um forte promotor induzível, denominado pAOX1, que controla a expressão do gene álcool oxidase (AOX1), envolvido na oxidação de metanol. Em *P. pastoris* existem dois genes que codificam para a álcool oxidase, AOX1 e AOX2. Todavia, 95% da atividade da álcool oxidase é atribuída à AOX1. O mecanismo de ativação deste gene envolve tanto a indução do seu promotor por metanol quanto a sua repressão pela ausência de outras fontes de carbono (TSCHOPP *et al.*, 1987). A concentração desta proteína pode alcançar cerca de 30% do total de proteínas solúveis.

O metanol, uma vez presente como única fonte de carbono no meio, é oxidado pela enzima álcool oxidase (AOX), gerando formaldeído e peróxido de hidrogênio. Essa enzima encontra-se dentro dos peroxissomos, onde converte o peróxido de hidrogênio, que é citotóxico, a H₂O e O₂, pelas catalases presentes nesta organela. Adicionalmente, o formaldeído restante, presente no citoplasma, é oxidado por duas desidrogenases citoplasmáticas, levando à formação de formato e CO₂. Todas estas reações proporcionam uma fonte adicional de energia para a levedura durante sua fase de crescimento em metanol (CEREGHINO e CREGG, 1999; CEREGHINO e CREGG, 2000).

Diversos são os relatos de proteínas expressas em *P. pastoris*, incluindo proteínas de membrana (AZAD *et al.*, 2009), anticorpos (PANJIDEH *et al.*, 2008) AMPs (LI *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2009), proteases e inibidores de proteinases (SRINIVASAN *et al.*, 2005), entre outros.

Além dessas proteínas, algumas defensinas de plantas foram expressas em *P. pastoris*: AX2, isolada de folhas de beterraba infectadas com o fungo *C. beticola* (KRISTENSEN *et al.*, 1999); PsD1, de *P. sativum* (ALMEIDA *et al.*, 2001); PpDfn1, de pêssogo (*Prunus persica*) (WISNIEWSKI *et al.*, 2003); Vrd1, de sementes de feijão-mungo (*Vigna radiata*) (CHEN *et al.*, 2004); e SPE10, isolada de sementes de *Pachyrrhizus erosus* (SONG *et al.*, 2005).

A defensina AX2 mostrou atividade contra *C. beticola*, com IC₅₀ de 2,5 µg/mL. A presença de um resíduo extra (arginina) no N-terminal da proteína recombinante influenciou na sua atividade biológica, quando comparada à selvagem, uma vez que demonstrou ser mais sensível a presença do Ca²⁺ (KRISTENSEN, *et al.*, 1999). ALMEIDA *et al.*, (2001) demonstraram que a defensina rPsD1 foi significativamente efetiva contra os fungos *N. crassa* e *Aspergillus versicolor*, quando comparadas à proteína nativa. Análises por RMN, dicróismo circular e fluorescência revelaram que a proteína recombinante produzida em *P. pastoris* apresentou a mesma conformação e o mesmo padrão na formação das pontes dissulfeto que a proteína nativa. Entretanto, o sequenciamento da proteína revelou a presença de um tetrapeptídeo no N-terminal (Glu-Ala-Glu-Ala) que levou a uma diminuição no potencial antifúngico da proteína contra *A. niger* e *F. solani*, quando comparadas à proteína nativa.

A defensina *PpDfn1* inibiu eficientemente a germinação dos fungos patogênicos *Penicillium expansum* e *B. cinerea*. Os resultados obtidos foram realizados tanto com a proteína purificada proveniente da expressão em *P. pastoris* quanto de extrato parcialmente purificado contendo a proteína recombinante (WISNIEWSKI, *et al.*, 2003).

A defensina de feijão-mungo, denominada VrD1, além de apresentar atividade inseticida, foi capaz de inibir o crescimento de diversos fungos. A proteína recombinante, rVrD1, foi ativa contra os fungos *F.oxysporum*, *P. oryza*, *R. solani*, e *Trichophyton rubrum*, além de inibir o desenvolvimento larval de *Callosobruchus chinensis* (CHEN *et al.*, 2004).

SONG *et al.*, (2005) relataram pela primeira vez a expressão de uma defensina dimérica, SPE10, isolada de sementes de *Pachyrrhizus erosus*. Análises por dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência indicaram que a proteína nativa e a recombinante apresentaram a mesma conformação estrutural, e foram ambas ativas contra diversos fungos patogênicos, incluindo *F. oxysporum f. sp. vasinfectum*, *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *B.cinerea*, *Bipolaris maydis*, *A. niger*, *F.oxysporum f. sp. lycopersici*, e *Rhizopus stolonifer*.

Neste trabalho, propõe-se a expressão da defensina Drr230a em sistema heterólogo utilizando a levedura metilotrófica *P. pastoris*. Esse peptídeo possui amplo espectro de atividade contra importantes fungos patogênicos, incluindo, *F. oxysporum*, *A. pinodes*, *T. reesei*, *A. lentis*, *F. solani*, *L. maculans*, *A. pisi* e *A. alternata*. Quando produzida em plantas transgênicas de canola, gerou resistência aos fungos *L. maculans* e *R. solani*. Entretanto, fungos como *F. solani f. sp. Glycines*, *C. gossypii var. cephalosporioides* e *M. phaseolina* causam importantes prejuízos ao cultivo de soja e algodão no Brasil, e ainda não existem métodos eficazes para o controle desses fitopatógenos.

Vale salientar que essa defensina não foi purificada da fonte natural e os resultados obtidos até o momento foram apenas com extrato parcialmente purificado. Sendo assim, métodos alternativos para a avaliação e a produção dessa proteína são necessários para a caracterização da sua atividade biológica contra os fungos alvo deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Expressar o gene de defensina de ervilha (*Pisum sativum*) *drr230a* na levedura metilotrófica *P. pastoris* e avaliar a sua atividade biológica contra fungos de importância agrônômica para as culturas de soja e algodão.

2.2 Objetivos específicos:

- Subclonar o gene *drr230a* (ID GenBank AF525685) de ervilha no plasmídeo pPICZ α A[®] (Invitrogen, Co.) para expressão em levedura *P. pastoris*;
- Transformar células de *P. pastoris*, linhagem X33, com o plasmídeo pPICZ α A construído;
- Determinar as condições de produção da proteína recombinante Drr230a;
- Purificar as proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade com metal imobilizado com níquel (IMAC);
- Avaliar a atividade biológica da rDrr230a sobre os fungos *F. solani* f. sp. *glycines*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Subclonagem do gene *drr230a*, no plasmídeo *pPZCaA*

O gene da defensina *drr230a* (ID GenBank AF525685) foi cedido por Pierre Fobert, do *National Research Council Canada Plant Biotechnology Institute*, pesquisador colaborador do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (LPPI), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Inicialmente, o gene foi amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se iniciadores (*primers*) para a inserção dos sítios de restrição *EcoRI* e *NotI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O primer 3' foi desenhado para inserir nessa região uma sequência codificante para seis histidinas (6xHis), visando a purificação com o uso de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). As sequências dos respectivos iniciadores são mostradas na tabela 2.

Na reação de amplificação, foram utilizados 10 μ M de cada iniciador, 50 mM de $MgSO_4$, 10 mM de cada dNTP, tampão da polimerase (600 mM de Tris- SO_4 (pH 8.9, 180 mM de Sulfato de Amônio) e 0,4 U/ μ L de *Taq* DNA polimerase de alta fidelidade (*Taq Platinum*[®] - Invitrogen, Co.), para cada amostra de DNA. As condições para amplificação foram as seguintes: 94°C durante 2 minutos; seguido de 30 ciclos de 45 segundos, a 94°C; 55°C durante 45 segundos; 72°C durante 45 segundos; com extensão final a 72°C, durante 5 minutos. Posteriormente, o produto de PCR foi separado e visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de DNA de aproximadamente 200 pb foram excisados do gel e purificados utilizando o kit "GeneClean" II (Biolabs), conforme manual descrito pelo fabricante. Na reação de ligação do gene de defensina ao plasmídeo pGEM T-easy (Promega) foram utilizados 45 ng do plasmídeo, 30 ng do inserto, 1U/ μ L da enzima T4 DNA ligase em um 15 μ L de reação de ligação. A reação de ligação foi incubada durante 16 horas em banho de gelo, a uma temperatura de aproximadamente 15°C e posteriormente dialisada contra água para ser usada na transformação de células competentes de *E. coli* linhagem XL- I Blue, via eletroporação.

Na transformação foram utilizados 40 μ L de células competentes, juntamente com 2 μ L do sistema de ligação. Uma cubeta de eletroporação estéril de 0,1 cm foi usada em um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser TM com os seguintes parâmetros: 1,8 kV de voltagem, 200 Ω de resistência e 25 μ FD de capacitância. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura LB - Luria Bertani (Tryptona 1%, Extrato de Levedura 0,5%, Cloreto de Sódio 0,5%, pH 7,5) e incubadas durante 1 hora, a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, as células foram transferidas para placas com meio LB-ágar contendo ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubadas em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$, durante aproximadamente 16 horas. Os transformantes resistentes ao antibiótico foram selecionados e crescidos em meio LB líquido com ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 16 horas, a $37\pm 1^\circ\text{C}$. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o método da lise alcalina, conforme sugerido por SAMBROOK e RUSSELL, (2001).

A presença do gene foi confirmada em gel de agarose 1,5% com a liberação de um fragmento de aproximadamente 200 pb, observado pela digestão do DNA plasmidial com a enzima *EcoRI*. O clone positivo que liberou o fragmento de aproximadamente 200 pb e o DNA plasmidial foram digeridos com *NotI* e, em seguida, com *EcoRI*, conforme as recomendações do fabricante das enzimas. O DNA digerido foi analisado em gel de agarose 1% e os fragmentos de 200 pb (drr230a) e 3,9 kb (pPICZ α A) foram excisados da matriz de agarose e purificados utilizando-se o kit "GeneClean" II (Biolabs). Para análise da integridade do gene foi realizado o sequenciamento utilizando um seqüenciador automático ABI, com oligonucleotídeos específicos. As seqüências dos iniciadores são mostradas na tabela 2 e 3.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene *drr230a* para subclonagem no plasmídeo pPICZ α A. As sequências em caixas cinzas representam a região do iniciador complementar ao gene. O sítio de restrição para *EcoRI* ou *NotI* estão em amarelo. O códon de parada em vermelho, e em azul a sequência codificante para seis histidinas (6xHis).

Iniciador	Seqüência
DRR230a03Rev	5' tgggcggccgc tcaacagtttttagtgca 3' NotI
DRR230a02Rev	5' tgggcggccgc tca atgatgatgatgatg gcagtttttagtacaccaacagcgaaagtcac3' NotI 6 x His
DRR230a01for	5' gccgaattc aacacatgtgagaac 3' EcoRI

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do gene de defensina de ervilha (*drr230a*) subclonado no plasmídeo pPICZ α A e análise dos transformantes por PCR de colônia.

Iniciador	Seqüência
AOX 5' for	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3
AOX 3' rev	5'-AATGGCATTCTGACATCC-3'

Para a transformação de células competentes de *P. pastoris*, linhagem X33, com a construção *drr230a/pPICZ α A* (Figura 3), foram utilizados aproximadamente 30 μ g de DNA, previamente digeridos com a enzima *SacI*. Uma cubeta de eletroporação estéril de 0,2 cm foi usada em um eletroporador Bio-Rad Gene PulserTM com os seguintes parâmetros: 1,5 kV de voltagem, 400 Ω de resistência e 25 μ FD de capacitância.

Após a transformação por eletroporação, as células foram solubilizadas em 1 mL de sorbitol 1M, incubadas a 28 \pm 1°C durante 1 hora e, em seguida, semeadas em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose) contendo 100 μ g/mL de Zeocina (Invitrogen, Co.). Os clones que apresentaram resistência ao antibiótico foram analisados por PCR de colônia, conforme sugerido por LINDER *et al.*,(1996), usando-se os iniciadores específicos dos genes (Tabela 2) ou os que anelam na região do promotor e terminador AOX1 (tabela 3)

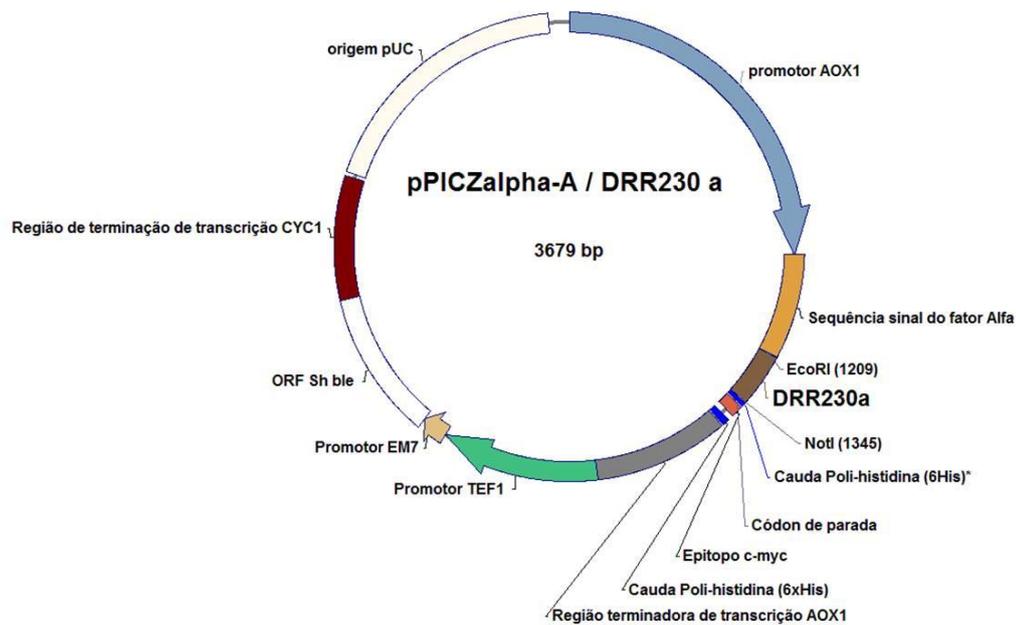


Figura 2: Mapa da construção do vetor pPICZ α A/Drr230a para expressão heteróloga em *P. pastoris*.

3.2 Seleção dos transformantes por ensaio de resistência a Zeocina e expressão de *drr230a* em *P. pastoris*

Com o intuito de selecionar os clones mais eficientes para expressão em *P. pastoris*, os confirmados por PCR de colônia foram semeados em meio YPD contendo 500 μ g/mL de Zeocina, conforme sugerido por VASSILEVA *et al.*, (2001b).

Os clones que apresentaram resistência ao antibiótico foram selecionados para expressão em *P. pastoris*. Para a produção de biomassa celular, 2 mL do pré inóculo, crescido em meio YPD durante 16 horas a 29 \pm 1°C, com agitação de 200 rpm, foram adicionados a 200 mL de meio BMG (1,34 % de YNB, 1% de glicerol, 4x 10⁻⁵ % Biotina, 100 mM de fosfato de potássio, pH 6,0). O inóculo foi incubado a 29 \pm 1°C, com agitação de 200 rpm, até atingir OD_{600nm} 20, cerca de 24 horas. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas para monitoramento da OD_{600nm} e para determinação da curva de crescimento da cultura. Após atingir a OD_{600nm} 20, o inóculo foi centrifugado a 1500 x g durante 5 minutos, e as células ressuspensas em 200 mL de meio BMM (1,34 % de YNB, 4x 10⁻⁵ % Biotina, 100mM de fosfato de potássio, pH 6,0 e 1% de metanol). Em seguida, a cultura foi incubada a 29 \pm 1°C, durante 96 horas, com agitação de 200 rpm. A cada 12 horas a cultura foi suplementada com metanol 1%, visando a indução, e a cada 24 horas alíquotas

foram retiradas para análise da expressão. Após 48 horas de expressão, o meio de cultura foi centrifugado a 1500 x g e as células ressuspensas novamente em meio BMM e mantidas durante 48 horas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$, com agitação de 200 rpm.

3.3 Detecção das proteínas recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-TRICINE-PAGE) e Western blot

As proteínas obtidas a partir da expressão em levedura *P. pastoris* foram precipitadas em Acetona/TCA 10%, quantificados pelo método de BRADFORD (1976) e separados por eletroforese em gel desnaturante de duas fases, em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE), conforme descrito por SCHAGGER e VON JAGOW (1987). O gel de duas fases (separação, 14% T e 2,5% C, pH 8,9; concentração, 4% T e 2 % C, pH 6,8), foi desenvolvido com tampão do catodo contendo Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1 % (pH 8,25), e do anodo contendo Tris 0,2 M (pH 8,9).

Cada amostra, contendo 20 μg de proteína, foi dissolvida em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl pH 6,8, SDS 8,2 % (p/v), sacarose 2% (p/v), azul de bromofenol 0,001% (p/v)) e fervida durante 10 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese durante aproximadamente 4 horas, a 70 V, em câmara fria. A eletroforese foi realizada usando-se o sistema *Mini Protean II Electroforesis Cell* (Bio-Rad).

As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,22 μM (*Hybond C*, Amersham), de acordo com o manual de transferência do equipamento *Trans-blot[®] SD Semi Dry* (Bio Rad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de gelatina 3% em TBS na concentração final de 1x durante 2 horas, sob agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal Anti-6xHis produzido em camundongo (diluído 1:2000 em TBS/gelatina 1%) conjugado a fosfatase alcalina[®] (Invitrogen) durante 4 horas. Após a incubação, a membrana foi lavada com tampão TBS - Tween 0,05%. Para a detecção das proteínas, a membrana foi incubada na solução de revelação, conforme descrito pelo fabricante do substrato para fosfatase alcalina (*AP Conjugate Substrate Kit* - Bio Rad).

O gel foi feito em duplicata, sendo que o primeiro foi usado para a imunodeteção, e o segundo para a coloração com *Coomassie Brilliant Blue* 0,1% (p/v) em 25% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

3.4 Purificação das proteínas recombinantes expressa em *P.pastoris*

Com o objetivo de purificar as proteínas secretadas advindas da expressão, o meio de cultura foi centrifugado a 3000 g, o pellet descartado e o sobrenadante filtrado em membrana millipore 0,22 µM. Em seguida, a amostra foi diluída na proporção 1:1 em tampão fosfato de sódio 40 mM, pH 7,4, e NaCl 500 mM e submetida a cromatografia de afinidade com metal imobilizado com níquel, usando-se a coluna HisTrap FF crude 1.6 × 2.5 cm (5 ml), da GE Healthcare. A coluna foi equilibrada com 7 volumes (35 mL) da solução de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 40 mM pH 7,4, NaCl 500 mM). A amostra foi aplicada na coluna em um fluxo de 4 mL/min e a fração não retida foi removida com 7 volumes (35 mL) da solução de lavagem (tampão fosfato de sódio 40 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM). A fração retida na coluna foi eluída com 7 volumes (35 mL) da solução de eluição contendo tampão fosfato de sódio (40 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM). O material eluído contendo a rDrr230a foi então dialisado contra H₂O, liofilizado e quantificado por densitometria em gel, utilizando-se Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão.

3.5 Bioensaios

3.5.1 Análise da atividade antifúngica da defensina recombinante *Drr230a*

Para avaliar a atividade da defensina Drr230a após a expressão em *P. pastoris*, bioensaios de inibição de crescimento micelial foram realizados contra os fungos *F. solani* f. sp. *glycines* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Para tanto, discos miceliais dos fungos foram dispostos no centro de placas de Petri contendo o meio PDB – *Potato Dextrose Broth* (DifcoTM) em ágar 2%. As placas foram incubadas durante três dias em câmara climatizada (BOD), a 28±1°C. Após esse período, discos de papel estéreis contendo aproximadamente 120 µg de proteína total secretada, quantificadas segundo BRADFORD (1976), foram dispostos

paralelamente às hifas em crescimento. O antifúngico comercial Nistatina, na concentração de 200U/ μ L, foi utilizado como controle positivo, e como controle negativo foi utilizado o produto da indução de *P. pastoris* não transformada (linhagem X33).

Com o intuito de avaliar a atividade antifúngica após o processo de purificação, 150 μ g da rDrr230a foram usados para testes contra *F. solani* f. sp. *glycines*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina*. No ensaio contra *F. solani* f. sp. *glycines*, a amostra foi solubilizada em duas soluções. Esse teste foi realizado para determinar uma possível alteração na sua atividade biológica em função do tampão utilizado. A amostra foi solubilizada em meio BMM contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, e em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0. Para os demais fungos, as amostras foram solubilizadas apenas em Tris-HCl pH 7,0. As placas foram incubadas em câmara climatizada (BOD), a $28\pm 1^\circ\text{C}$, durante aproximadamente 96 horas, para a observação da inibição sobre o crescimento dos fungos. Os ensaios foram realizados em triplicata e fotografados, e a área de inibição do crescimento micelial foi medida com o uso do *Software UTHSCSA Image Tool, Version 3.00 (University of Texas - Health Science Center)*. A análise estatística (ANOVA) foi realizada pelo software Genes (Universidade Federal de Viçosa –MG).

4. RESULTADOS

4.1 Subclonagem do gene *drr230a*, no plasmídeo *pPICZαA*.

Para confirmação da construção no vetor de replicação *pGem-T easy*[®], o DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. O resultado da análise revelou a presença de um fragmento de aproximadamente 200 pb referente ao gene da defensina (figura 3). Posteriormente, os fragmentos de DNA foram excisados, purificados, digeridos e subclonados no plasmídeo *pPICZαA*, visando a expressão em *P. pastoris*. A análise do DNA dos clones por digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI* confirmou a presença do gene da defensina *drr230a* em 5 clones analisados (Figura 4).

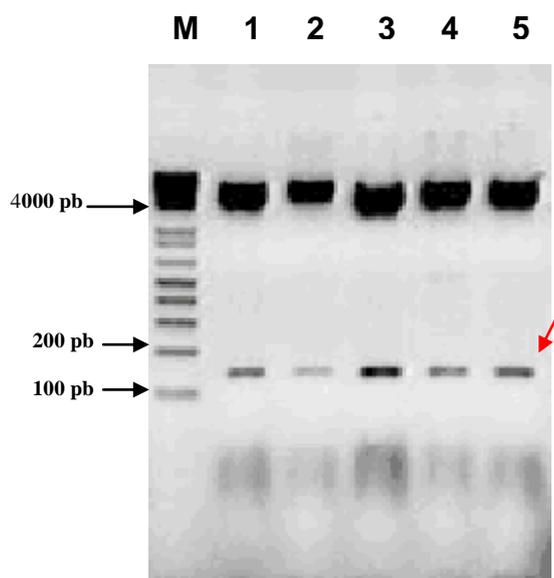


Figura 3: Análise da digestão do plasmídeo *pGEM-T-Easy/drr230a* com a enzima de restrição *EcoRI*. Gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio. M: marcador (1 Kb plus[®] INVITROGEN); 1-5: clones positivos. A seta em vermelho indica o fragmento de aproximadamente 200 pb referente ao gene da defensina *drr230a*.

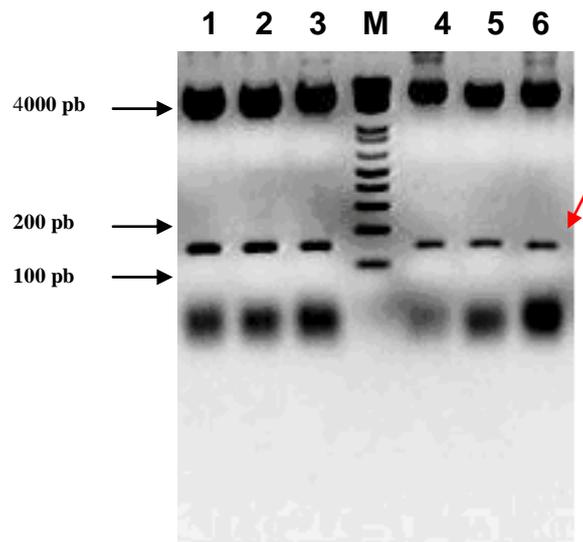


Figura 4: Análise da digestão do plasmídeo pPICZ α A/drr230a com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio. **M:** marcador (1 Kb plus® INVITROGEN); **1-6:** clones positivos. A seta em vermelho indica o fragmento de aproximadamente 200 pb referente ao gene da defensina *drr230a*.

Dentre os 42 clones obtidos após a transformação com a construção Drr230a/pPICZ α A, 30 foram PCR positivos para o gene *drr230a*. Foram considerados positivos aqueles que amplificaram um fragmento de aproximadamente 200 pb ou de 550 pb (dados não mostrados). Vale salientar que os clones que liberaram um fragmento de 550 pb refere-se aos que na PCR de colônia foram utilizados os oligonucleotídeos que anelam na região do promotor e terminador AOX1 conforme descrito na tabela 3.

Posteriormente, estes clones foram selecionados para ensaio de resistência ao antibiótico zeocina, conforme sugerido por VASSILEVA et al.,(2001b).

4.2 Seleção dos transformantes por ensaio de resistência a Zeocina e expressão de Drr230a em *P. pastoris*.

Para selecionar os clones com maior eficiência para expressão em *P. pastoris*, aqueles confirmados por PCR de colônia foram semeados em triplicata em meio YPD contendo 500 μ g/mL de Zeocina. Dentre os clones PCR positivos, 9 exibiram resistência ao antibiótico testado (Figura 5) e foram selecionados para expressão em *P. pastoris*.

Visando a determinação da curva de crescimento da cultura, 4 clones foram escolhidos aleatoriamente. A cada 24 horas de expressão, alíquotas foram retiradas para monitoramento da OD_{600nm} (Figura 6).

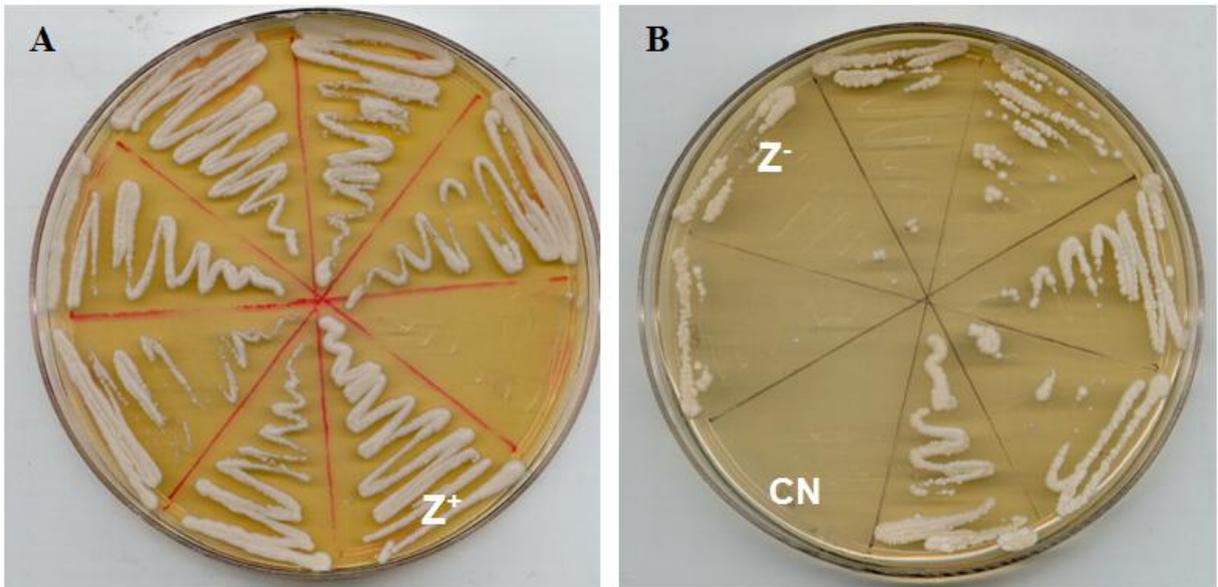


Figura 5: Seleção dos clones zeocina resistentes para expressão em *P. pastoris*. **A:** Z⁺ Clones positivos; **B:** Z⁻ Clones negativos, CN Controle negativo: *P. pastoris* não transformada, linhagem X33.

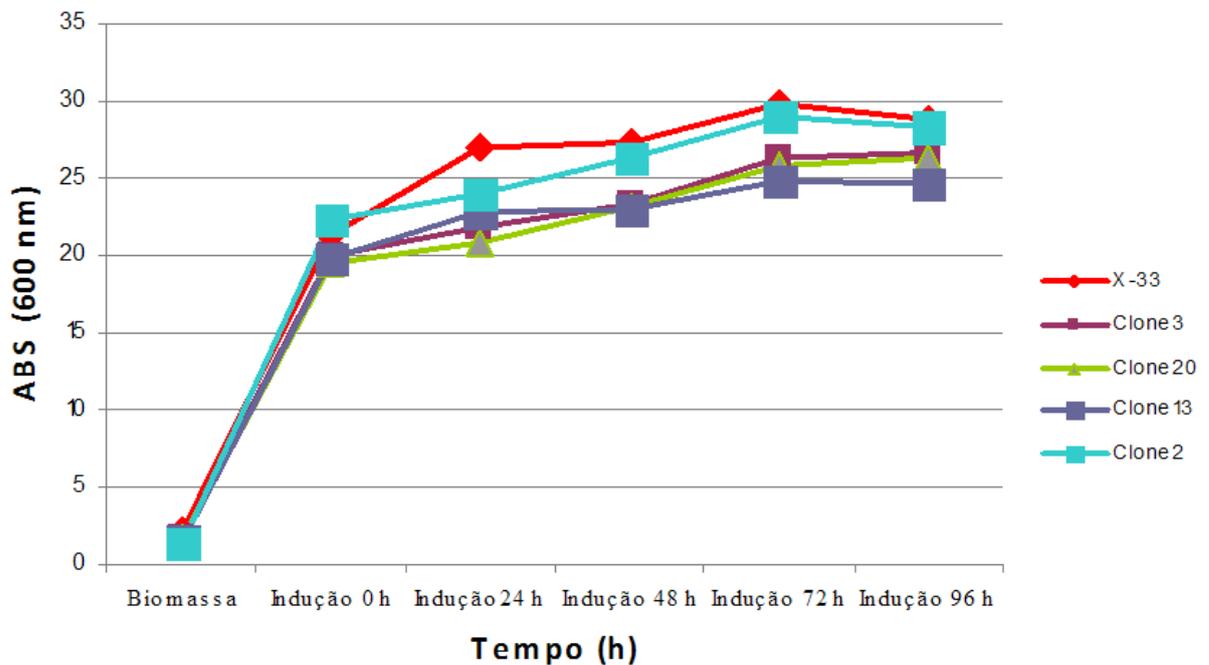


Figura 6: Curva de crescimento dos clones de *P.pastoris* expressando Drr230a. O crescimento das culturas foi monitorado pela medição da OD₆₀₀ a cada 24 horas.

Após a análise do crescimento das culturas e do nível de expressão dos 4 clones selecionados (tabela 4), o clone 2 foi escolhido para a expressão da proteína recombinante Drr230a. Embora tenha apresentado uma proporção equivalente de proteína expressa (ng/μl), este apresentou uma maior taxa de crescimento quando comparado ao controle da expressão (Linhagem X - 33) e aos demais clones.

Tabela 4: Concentração de proteína total secretada (ng/μl) após expressão em *P. pastoris*.

Defensina Drr230a	Concentração de proteína (ng/μl)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Clone 2	52,56	74,76	57,32	66,43
Clone 3	57,36	71,46	59,72	69,57
Clone 13	46,74	71,86	52,28	59,93
Clone 20	55,07	71,46	59,24	63,75

4.3 Análise das proteínas recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-TRICINE-PAGE) e Western blot

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que as células contendo o plasmídeo com o gene da defensina *drr230a* produziu uma proteína com massa molecular aproximada de 6 kDa, valor esperado para a proteína recombinante Drr230a. A expressão foi detectada em todos os tempos analisados – 24, 48, 72 e 96 horas.

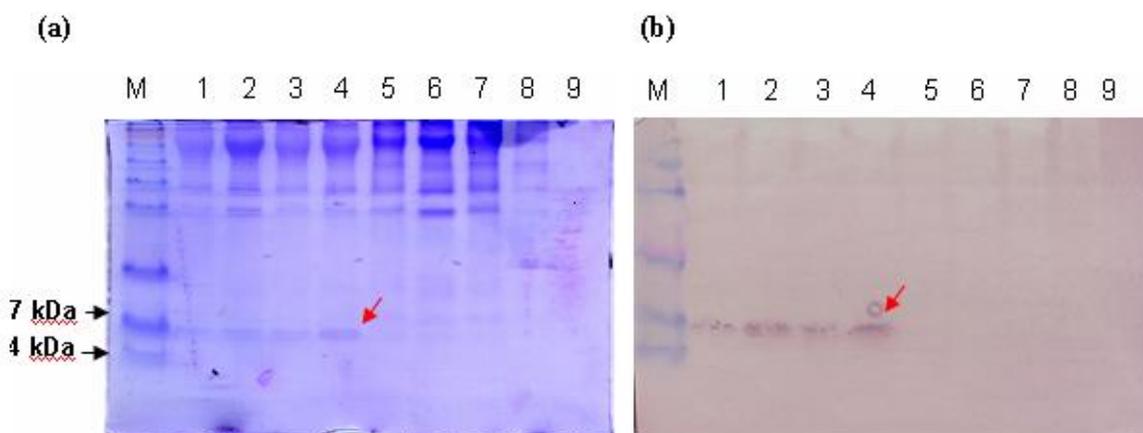


Figura 7: Análise por SDS-TRICINE-PAGE e Western blot da expressão de rDrr230a em *P. pastoris*. **(a)** Gel tricina 14% e **(b)** Western blot: Linhas 1, 2, 3 e 4: 24, 48, 72 e 96 h; Linhas 6, 7, 8, 9: Controle negativo 24, 48, 72 e 96 h. As setas em vermelho indicam a proteína recombinante Drr230a com massa molecular aproximada de 6kDa.

4.4 Purificação das proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris*

A purificação da proteína recombinante foi realizada por meio de cromatografia de afinidade com metal imobilizado com níquel (IMAC), utilizando-se a coluna HisTrap FF crude (GE Healthcare). A análise por *SDS-TRICINE-PAGE* corado com prata, no qual foram aplicados ~ 3 µg de proteína, revelou a presença de apenas uma banda de ~ 6kDa correspondente à proteína recombinante *Drr230a* (Figura 8). O rendimento após a expressão e purificação foi de aproximadamente 2,5% (3,5 mg/L) de proteína.

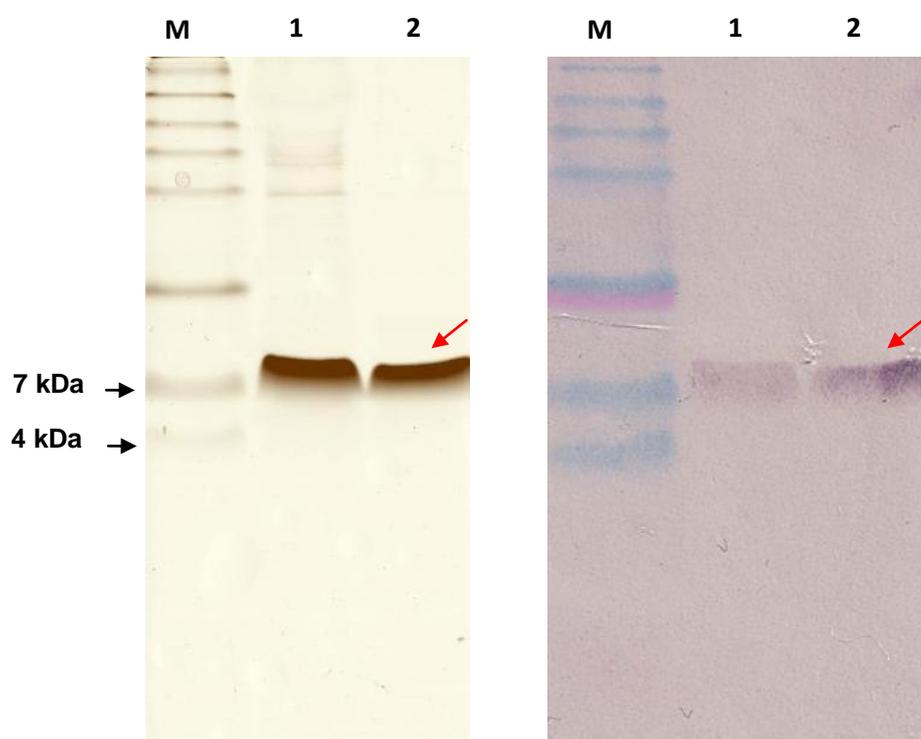


Figura 8: Análise por SDS-TRICINE-PAGE e Western blot da purificação de rDrr230a expressa em *P. pastoris*. **(a)** Gel tricina 14%; **(b)** Western blot (anticorpo anti-His) **M:** Marcador de massa molecular de proteína (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard – Invitrogen; **1:** Sobrenadante de *P. pastoris* contendo a proteína recombinante Drr230a; **2:** Fração eluída da coluna contendo a proteína recombinante *Drr230a* com massa molecular aproximada de 6kDa.

4.5 Bioensaios

4.5.1 Análise da atividade biológica da defensina recombinante *Drr230a*

Os ensaios realizados para avaliar a atividade antifúngica da defensina *rDrr230a* após 48 e 96 horas de expressão, utilizando-se 120 µg de proteína total secretada, revelaram que o crescimento micelial dos fungos *F. solani* f. sp. *glycines* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi reduzido quando comparado a linhagem X33 não transformada - controle negativo (Figura 9). Embora não tenha sido formado um halo de inibição observou-se uma alteração no padrão de coloração do micélio próximo aos discos. Tal fato não pode ser observado nos controles positivo e negativo.

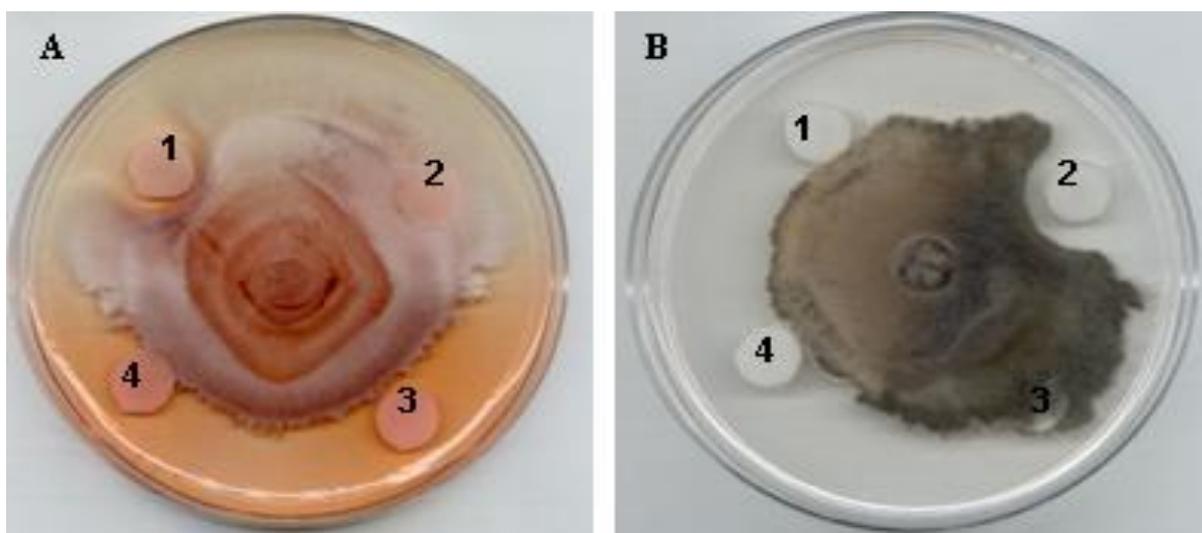


Figura 9: Atividade antifúngica da defensina *rDrr230a* após 48 e 96 horas de expressão. **A:** Ensaio contra *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **1:** Controle positivo (200 U/µL de Nistatina); **2:** Controle negativo (*P. pastoris*, linhagem X33 não transformada); **3 e 4:** 120 µg de proteína total de *P. pastoris* (48 e 96 h de expressão, respectivamente); **B:** Ensaio contra *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **1:** 120 µg de proteína total de *P. pastoris* (48 h de expressão); **2:** Controle positivo (200 U/µL de Nistatina); **3:** Controle negativo (*P. pastoris*, linhagem X33, não transformada); **4:** 120 µg de proteína total de *P. pastoris* (96 h de expressão).

Após purificação das proteínas recombinantes expressas, bioensaios foram também realizados com a proteína rDrr230a purificada. Foram testados aproximadamente 150 μg da proteína recombinante ($3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) contra os fungos *F. solani* f. sp. *glycines*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina*.

No ensaio contra *F. solani* f. sp. *Glycines*, a atividade da proteína recombinante purificada foi testada em diferentes condições de pH. Observou-se que a rDrr230a foi ativa tanto em meio BMM, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, como em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 (Figura 10A). De acordo com a ANOVA, a área de inibição foi estatisticamente diferente para os dois tampões testados $F = 200,430$ $p=(0,000145;C.V=4,97)$ (figura 10B). Aparentemente, neste tampão a atividade da rDrr230a foi ligeiramente maior quando comparado com o meio de cultura contendo o tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0.

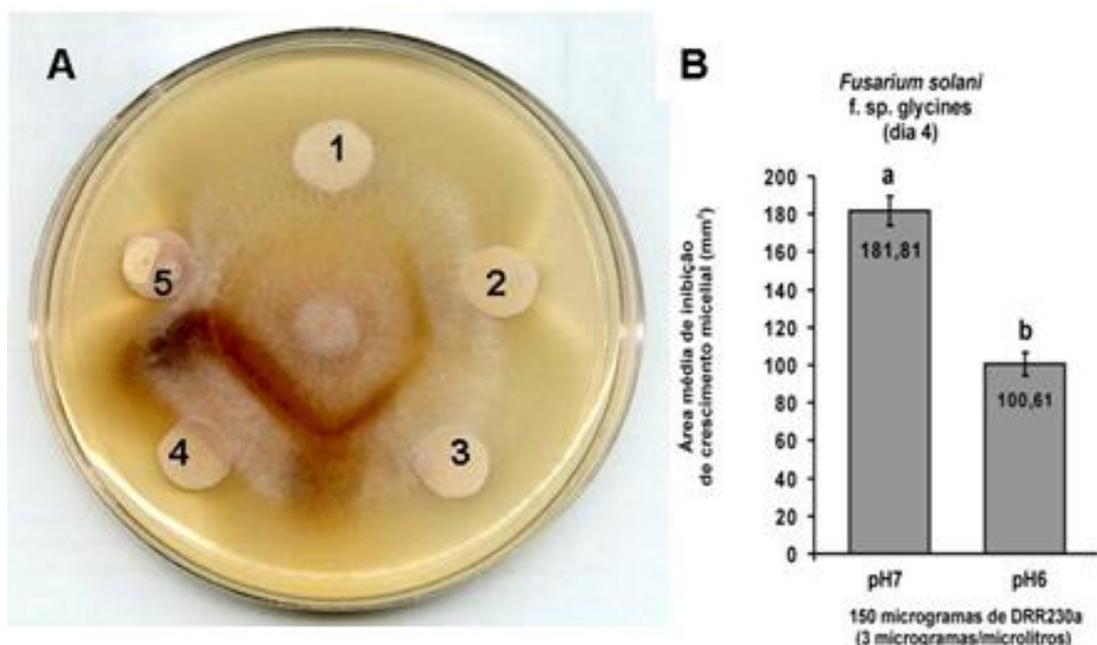


Figura 10: Atividade antifúngica da defensina rDrr230a purificada contra *Fusarium solani* f. sp. *glycines* e área de inibição do crescimento micelial em tampões com diferentes pH. **A:** 1: Controle negativo (Tris -HCl 10 mM, pH 7,0); 2: $3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de rDrr230a purificada em Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; 3: Controle negativo (meio BMM); 4: $3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de rDrr230a purificada em meio BMM; 5: Controle positivo (200 U/ μL de Nistatina). **B:** Área de inibição do crescimento micelial em pH 6 e pH 7. As letras a e b em minúsculo indicam que elas foram estatisticamente diferentes entre si.

A partir deste resultado, os ensaios contra os demais fungos foram realizados apenas com o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0,. Assim como observado no ensaio contra *F. solani* f. sp. *glycines*, a rDrr230a, expressa em *P. pastoris*, também foi capaz de inibir o crescimento micelial dos fungos *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina* (Figura 11). Pode-se observar que além da formação do halo de inibição, uma alteração no padrão de coloração do micélio pode ser visualizada na região próxima aos discos onde continham as amostras testadas.

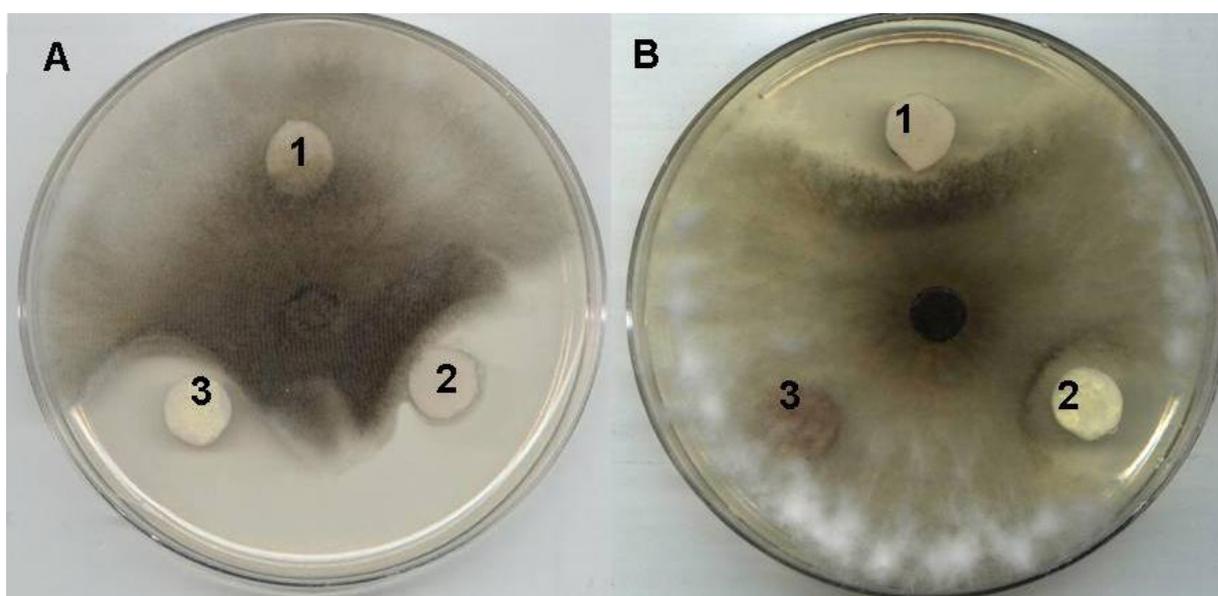


Figura 11: Atividade antifúngica da defensina rDrr230a purificada contra *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. e *Macrophomina phaseolina*. **A:** Ensaio contra *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **1:** Controle negativo (Tris -HCl pH 7,0); **2:** 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de rDRR230a em Tris -HCl pH 7,0; **3:** Controle positivo (200 U/ μL de Nistatina). **B:** Ensaio contra *Macrophomina phaseolina*. **1:** 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de rDRR230a em Tris -HCl pH 7,0; **2:** Controle positivo (200 U/ μL de Nistatina); **3:** Controle negativo (Tris -HCl pH 7,0).

5. DISCUSSÃO

A expressão de proteínas heterólogas com interesse biotecnológico tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Nesse contexto, *P. pastoris* tem sido comumente utilizada como sistema de expressão de diversas proteínas, alcançando resultados satisfatórios.

Neste trabalho, *P. pastoris* foi utilizada para a expressão de uma defensina de ervilha (Drr230a), por apresentar todas as características necessárias para o processamento adequado da molécula. Cabe ressaltar que o sistema procariótico não é capaz de realizar as modificações pós-traducionais necessárias à obtenção de moléculas ativas, como formação de pontes dissulfeto, glicosilações, entre outras.

A expressão de proteínas ricas em pontes dissulfeto em células procarióticas é quase sempre ineficiente, sendo necessário um rearranjo da proteína para que ela retorne às condições nativas e mantenha a sua atividade. Além disso, é comum a formação de corpos de inclusão e a ocorrência de degradação proteolítica (MACAULEY-PATRICK, *et al.*, 2005).

Algumas proteínas não são eficientemente expressas em bactérias, *S. Cerevisiae* ou em baculovírus, como é o caso da proteína G acoplada a receptores. Esta proteína foi eficientemente expressa na sua forma ativa em *P. pastoris*, apresentando a mesma conformação da proteína nativa (MACAULEY-PATRICK, *et al.*, 2005).

A defensina VRD1, isolada de feijão mungo (*V. radiata*), foi primeiramente expressa como proteína de fusão em *E. coli*, mas o nível de expressão não foi satisfatório (CHEN *et al.*, 2002). A produção desta proteína em *P. pastoris* resultou em maiores níveis de expressão e a atividade biológica foi similar à alcançada em *E. coli* (CHEN *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004).

A defensina de inseto Mdde, presente na mosca doméstica (*Musca domestica*) é outro exemplo. Este peptídeo atua primariamente contra bactérias Gram-positivas e são constitutivamente expressos na epiderme desses insetos. A expressão desse peptídeo em *E. coli* não foi eficiente, quando comparado com a expressão em *P. pastoris*. O rMdde, expresso em *E. coli*, representou cerca de 30-34% do total de proteínas, todavia, exibiu baixa atividade, provavelmente devido à formação inadequada das pontes dissulfeto (WANG *et al.*, 2006).

Sendo assim, o gene de defensina *drr230a* foi subclonado no plasmídeo pPICZ α A para a expressão em *P. pastoris*, com a finalidade de avaliar a atividade biológica da proteína recombinante contra diversos fungos de interesse agrônômico, incluindo *F. solani* f. sp. *glycines*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina* que causam perdas significativas a culturas de soja e algodão no país. Os resultados indicam que a defensina foi eficientemente expressa nas condições testadas, alcançando um rendimento de aproximadamente 2,5 % (3,5 mg/L) após expressão e purificação.

Diversos métodos podem ser utilizados para a otimização da expressão. A produção de grandes quantidades de proteína em frascos de cultura é difícil de ser alcançado devido a inúmeros fatores, como limitação do volume, oxigênio, baixa densidade celular, adição de substratos, dentre outras. Por outro lado, a expressão realizada em fermentadores possibilita que níveis maiores da proteína de interesse sejam alcançados, em função da otimização das condições de temperatura, pH, fonte de carbono, aeração, entre outros fatores, podendo chegar a rendimentos aproximados de g/L da proteína de interesse (CEREGHINO *et al.*, 2002).

Uma das abordagens que visam o incremento do nível de expressão emprega o uso de clones contendo múltiplas cópias integradas no genoma da levedura (VASSILEVA *et al.*, 2001a). A seleção de clones com um número maior de cópias do gene é possível por meio de ensaios de resistência ao antibiótico Zeocina, ou de análises por *Southern blotting*. Estudos demonstram que a capacidade dos clones transformantes de tolerar o aumento da concentração de Zeocina tem correlação direta com o aumento do número de cópias presente no genoma. Os clones que possuem a capacidade de crescer na concentração de 100 μ g/mL do antibiótico apresentam apenas uma cópia integrada. Aqueles que crescem em concentrações de 500, 1000 ou 2000 μ g/mL possuem 2, 3 ou 4 cópias integradas do gene *Sh ble*, no genoma. Esta correlação foi confirmada por análises quantitativas de *Southern blotting* (VASSILEVA *et al.*, 2001b).

No presente trabalho, embora não tenha sido analisado o número de cópias integradas no genoma da levedura por meio de *Southern blotting*, a seleção dos transformantes por ensaio de resistência ao antibiótico Zeocina permitiu que clones mais eficientes na produção da proteína recombinante fossem selecionados para expressão em *P. pastoris*. Este fato foi confirmado por maiores níveis de expressão

detectados nos clones selecionados, os quais apresentaram maior resistência ao antibiótico

Alguns relatos da literatura demonstraram que defensinas de planta foram eficientemente expressas em *P. pastoris*, sendo ativas contra diversos fungos (KRISTENSEN *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2001; WISNIEWSKI *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2005).

A defensina AX2, quando expressa em *P. pastoris*, apresentou a mesma conformação da proteína nativa e ambas foram ativas contra *C. Beticola*. A proteína recombinante foi ativa contra *C. beticola* com IC₅₀ de 2,5 µg/mL. Entretanto, apresentou maior sensibilidade ao íon Ca²⁺, quando comparada à selvagem. Este fato pode ser explicado pela presença de um resíduo extra (arginina) no N-terminal da proteína, o que influenciou na sua atividade biológica, sendo necessário uma maior concentração de proteína para inibir o crescimento do fungo (KRISTENSEN, *et al.*, 1999).

O mesmo pode ser observado para a defensina *PpDfn1* de pêssigo (*P. pérsica*). Ensaio antifúngico realizados com a proteína purificada proveniente da expressão em *P. pastoris*, com extrato parcialmente purificado, demonstraram que a proteína recombinante produzida inibiu eficientemente a germinação dos fungos patogênicos *P. expansum* e *B. cinérea* (WISNIEWSKI, *et al.*, 2003). Observou-se, também, que o r*PpDfn1* foi capaz de inibir 95% da germinação dos esporos de ambos os fungos, com concentrações de 20 µg/mL e 80 µg/mL, respectivamente.

ALMEIDA *et al.*,(2001) demonstraram que a defensina r*PsD1* de ervilha (*P. sativum*), expressa em *P. pastoris*, foi efetiva quando testada contra os fungos *N. crassa* (IC₅₀ ~ 10 µg/mL) e *Aspergillus versicolor* (IC₅₀ ~ 100 µg/mL). Observou-se que a presença de um tetrapeptídeo no N-terminal (Glu-Ala-Glu-Ala) da proteína recombinante levou a uma diminuição no potencial antifúngico contra *A. niger* e *F. solani*, quando comparada à proteína nativa. A presença deste peptídeo adicional sugere que a proteína recombinante não apresentou a conformação necessária para a sua atividade, ou que a quantidade de proteína produzida excedeu o poder catalítico da protease STE13 para a efetiva clivagem do peptídeo sinal. Posteriormente, CABRAL *et al.*, 2003 otimizando o sistema de clonagem e expressão, demonstraram que a proteína recombinante apresentou as mesmas características estruturais e funcionais da proteína *PSD1* nativa, fato este

comprovado por espectrometria de massa, dicroísmo circular, RMN e ensaios antifúngicos.

Adicionalmente, uma defensina isolada de sementes de *P. erosus*, denominada *SPE10*, foi eficientemente expressa em *P. pastoris*. Análises do sequenciamento do N terminal e espectroscopia de massa confirmaram que a r*SPE10* foi expressa corretamente e é ativa contra diversos fungos patogênicos, incluindo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *V. dahliae*, *A. flavus*, *Penicillium* spp., *C. gloeosporides*, *B. cinerea*, *B. maydis*, *A. niger*, *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* e *R. stolonifer*, quando comparada à proteína nativa (SONG *et al.*, 2005).

A defensina *Drr230a*, alvo deste estudo, é fortemente induzida em ervilha (*P. sativum*) em resposta a infecções pelos fungos *F. solani* f. sp. *pisi* e *F. solani* f. sp. *phaseoli* (HADWIGER e CHIANG, 1991). Após a identificação deste peptídeo, ele foi constitutivamente expresso em plantas transgênicas de canola (*Brassica napus*) conferindo resistência à doença canela-preta, causada pelo fungo *L. maculans* (WANG *et al.*, 1999). Além disso, foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade de plantas infectadas com o fungo biotrófico *R. solani*, e em folhas inoculadas com o fungo *S. sclerotium* diminuiu as lesões 48 horas após a inoculação, levando ao retardo do desenvolvimento da doença (WANG e FRISTENSKY, 2001). Quando expressa em plantas transgênicas de tabaco, inibiu o desenvolvimento de diversos fungos, entre eles *F. oxysporum*, *A. pinodes*, *T. reesei*, *A. lentis*, *F. solani*, *L. maculans*, *A. pisi* e *A. alternata* (LAI *et al.*, 2002). No entanto, experimentos mais refinados precisam ser realizados, uma vez que a atividade exibida pela defensina pode estar relacionada à ação sinérgica entre esta proteína e compostos endógenos do tabaco. Sugere-se que a presença de enzimas hidrolíticas presentes no extrato de folhas, como quitinases e glucanases, possam ter impedido a avaliação adequada da defensina.

No presente trabalho, a r*Drr230a* foi eficientemente expressa na sua forma ativa em *P. pastoris*. A utilização da r*Drr230a* purificada em ensaios contra os fungos *F. solani* f. sp. *glycines*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina* demonstrou que a proteína recombinante foi capaz de inibir o crescimento micelial dos referidos fungos na concentração de 3 µg/µL.

Apesar de os ensaios biológicos terem sido realizados em nível qualitativo, os resultados obtidos comprovam a atividade antimicrobiana da r*Drr230a*. A alteração

no padrão de coloração do micélio dos fungos, observada em todos os ensaios realizados, pode estar relacionado à resposta do fungo contra a presença da proteína recombinante, uma vez que o mesmo padrão não pode ser observado nos controles.

Em relação à atividade da defensina recombinante em diferentes tipos de tampão, os resultados mostram que ela foi ativa tanto no tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, quanto no meio BMM contendo o tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0. O tampão Tris-HCl é comumente utilizado para a solubilização dessas proteínas (ALMEIDA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2009) e os resultados obtidos sugerem que a atividade da proteína parece ser melhor nesse tampão do que no meio BMM.

É importante destacar que a presença de íons K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} podem interferir na atividade de defensinas (TERRAS *et al.*, 1992; TERRAS *et al.*, 1993; OSBORN *et al.*, 1995) pois a força catiônica do meio interfere na interação entre a defensina carregada positivamente e a superfície negativa da membrana fúngica. Adicionalmente, a alta força iônica do meio pode impedir que interações eletrostáticas relevantes para o complexo sejam formadas entre os receptores de defensinas e a membrana fúngica, ocasionando uma alteração da atividade antimicrobiana desta molécula (BROEKAERT *et al.*, 1995; THEVISSSEN, *et al.*, 1999). Neste contexto, SONG *et al.*, (2005) demonstraram que a atividade da rSPE10 foi fortemente reduzida na presença de 10 mM de $CaCl_2$. O mesmo foi relatado para a defensina AX2, quando 1 mM de Ca^{2+} foi adicionado ao meio de crescimento contendo 2,5 $\mu g/mL$ da proteína recombinante, acarretando a redução da sua atividade (KRISTENSEN, *et al.*, 1999). Essas evidências sugerem que o íon K^+ , presente no meio de cultura BMM, pode ter interferido na atividade antifúngica da rDrr230a.

Sendo assim, ensaios com rDrr230a purificada e solubilizada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, mostraram que a proteína recombinante foi efetiva no controle do crescimento micelial de todos os fungos testados. A concentração necessária para a atividade inibitória foi de aproximadamente 150 μg (3 $\mu g/\mu L$).

É importante destacar que os resultados apresentados neste trabalho são inéditos, no que se refere à atividade desta defensina contra os fungos alvo. CAMPOS *et al.*, (2008) relataram dados semelhantes para uma osmotina, isolada de *Solanum nigrum*, denominada SnOLP. Esta proteína foi expressa em *E. coli*,

purificada e, após renovelamento *in vitro*, inibiu o crescimento micelial dos fungos *F. solani* f. sp. *glycines*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina*. Da mesma forma que a defensina de ervilha Drr230, esta molécula também está envolvida na resposta de defesa contra o ataque de fitopatógenos.

Por fim, os resultados obtidos evidenciam o grande espectro de atividade da defensina Drr230a. Embora ensaios a nível quantitativo sejam necessários, os resultados contidos neste estudo constituem uma base preliminar de dados que poderão abrir novas perspectivas de aplicação destes genes na geração de plantas de soja e algodão geneticamente modificados, visando a resistência aos fungos fitopatogênicos *F. solani* f. sp. *glycines* , *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina* .

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1. A defensina Drr230a de ervilha (*P. sativum*) foi eficientemente expressa por *P. pastoris* na sua forma ativa.
2. Os níveis de expressão alcançados (3,5 mg/L) foram suficientes para a realização dos bioensaios e condizem com outros relatados na literatura.
3. A defensina recombinante rDrr230a foi capaz de inibir o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *F. solani* f. sp. *glycines*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *M. phaseolina*, o que a torna uma possível candidata para o desenvolvimento de plantas de soja e algodão resistentes a esses fitopatógenos.

7. PERSPECTIVAS

A fermentação em bioreatores será uma alternativa para melhorar o rendimento da expressão de rDrr230a. Uma vez estabelecidas as condições para a expressão em bioreatores, novos estudos poderão ser realizados.

Ensaio de inibição de germinação de esporos e bioensaios *in planta* estão em andamento para avaliar a atividade desta defensina contra o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja, doença que provoca perdas significativas na produção dessa *commodity*. Portanto, a identificação da atividade contra esse fungo abrirá novas perspectivas para o controle desse fitopatógeno e poderá ser utilizada em programas de melhoramento via transgenia.

Estudos sobre a interação com lipossomas artificiais de fosfolipídeos serão realizados com o intuito de investigar o modo de ação desta defensina. Tais estudos serão realizados por meio de observações da cinética de vazamento de fluoróforo (carboxifluoresceína) para fora do lipossoma, vazamento este motivado por interações da defensina modelo com lipídeos da membrana mimética.

Por fim, experimentos com mutagênese sítio-dirigida permitirão a análise da importância de cada resíduo de aminoácido para a atividade antimicrobiana da defensina Drr230a.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. S.; CABRAL, K. S.; DE MEDEIROS, L. N.; VALENTE, A. P.; ALMEIDA, F. C. L.; KURTENBACH, E., cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 395, n. 2. p. 199-207. 2001.

ALMEIDA, M. S.; CABRAL, K. M.; KURTENBACH, E.; ALMEIDA, F. C.; VALENTE, A. P., Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 4. p. 749-757. 2002.

ALMEIDA, A. M. R.; ABDELNOOR, R. V.; ARIAS, C. A. A.; CARVALHO, V. P.; JACOUD FILHO, D. S.; MARIN, S. R. R.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; CARVALHO, C. G. P., Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. p. 279-285. 2003.

ANURADHA, T. S.; DIVYA, K.; JAMI, S. K.; KIRTI, P. B., Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 11. p. 1777-1786. 2008.

AZAD, A. K.; SAWA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIBATA, H., Expression of plasma membrane aquaporins from tulip petals in *Pichia pastoris* for water channel analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v., n. p. 2009.

BERROCAL-LOBO, M.; SEGURA, A.; MORENO, M.; LOPEZ, G.; GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A., Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3. p. 951-961. 2002.

BLOCH, C. JR.; RICHARDSON, M., A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, n. 1. p. 101-104. 1991.

BLOCH, C. JR.; PATEL, S. U.; BAUD, F.; ZVELEBIL, M. J.; CARR, M. D.; SADLER, P. J.; THORNTON, J. M., 1H NMR structure of an antifungal gamma-thionin protein SIalpha1: similarity to scorpion toxins. **Proteins**, v. 32, n. 3. p. 334-349. 1998.

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

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

BROEKAERT, W. F.; MARIEN, W.; TERRAS, F. R. G.; DEBOLLE, M. F. C.; PROOST, P.; VANDAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A., Antimicrobial Peptides from *Amaranthus caudatus* Seeds with Sequence Homology to the Cysteine Glycine-Rich Domain of Chitin-Binding Proteins. **Biochemistry**, v. 31, n. 17. p. 4308-4314. 1992.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; EGGERMONT, K.; CAMMUE, B. P. A.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N. V.; OSBORN, R. W.; KESTER, A.; REES, S. B., Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish - Role in Host-Defense. **Journal of Cellular Biochemistry**, v., n. p. 86-86. 1994.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R.; CAMMUE, B. P.; OSBORN, R. W., Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4. p. 1353-1358. 1995.

BROEKAERT, W. F.; CAMMUE, B. P. A.; DEBOLLE, M. F. C.; THEVISSSEN, K.; DESAMBLANX, G. W.; OSBORN, R. W., Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 3. p. 297-323. 1997.

BRUIX, M.; JIMENEZ, M. A.; SANTORO, J.; GONZALEZ, C.; COLILLA, F. J.; MENDEZ, E.; RICO, M., Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. **Biochemistry**, v. 32, n. 2. p. 715-724. 1993.

CABRAL, K. M.; ALMEIDA, M. S.; VALENTE, A. P.; ALMEIDA, F. C.; KURTENBACH, E., Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. **Protein Expression and Purification**, v. 31, n. 1. p. 115-122. 2003.

CAMMUE, B. P. A.; DEBOLLE, M. F. C.; TERRAS, F. R. G.; PROOST, P.; VANDAMME, J.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W. F., Isolation and Characterization of a Novel Class of Plant Antimicrobial Peptides from *Mirabilis jalapa* L Seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 4. p. 2228-2233. 1992.

CAMPOS, M.A.; SILVA, M. S.; MAGALHAES, C. P.; RIBEIRO, S. G.; SARTO, R. P.; VIEIRA, E. A.; GROSSI DE SA, M. F., Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. p. 7. 2008.

CASSETARI NETO, D.; SANTOS, E. N.; ZAMBENEDETTI, E. B.; LEITE, J. J.; VALCANIAIA, E.; ARAUJO, D. V.; ANDRADE, J. R.; AVILA, W. P.; CAYE, S.; AENHOLD, D. In **Controle de fungos na parte aérea do algodão no Mato Grosso III Congresso Brasileiro de Algodão**, Campo Grande, 2001; Campo Grande, 2001.

CEREGHINO, G. P.; CREGG, J. M., Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5. p. 422-427. 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M., Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Fems Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1. p. 45-66. 2000.

CEREGHINO, G. P.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M., Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4. p. 329-332. 2002.

CHAN, Y. L.; PRASAD, V.; SANJAYA; CHEN, K. H.; LIU, P. C.; CHAN, M. T.; CHENG, C. P., Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. **Planta**, v. 221, n. 3. p. 386-393. 2005.

CHEN, K. C.; LIN, C. Y.; KUAN, C. C.; SUNG, H. Y.; CHEN, C. S., A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25. p. 7258-7263. 2002.

CHEN, J. J.; CHEN, G. H.; HSU, H. C.; LI, S. S.; CHEN, C. S., Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris* (vol 52, pg 2256, 2004). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13. p. 4350-4350. 2004.

CONAB, **Avaliação da Safra Agrícola 2005/2006 – Sétimo Levantamento – Junho/2006**. . 2006.

DE SAMBLANX, G. W.; GODERIS, I. J.; THEVISSSEN, K.; RAEMAEEKERS, R.; FANT, F.; BORREMANS, F.; ACLAND, D. P.; OSBORN, R. W.; PATEL, S.; BROEKAERT, W. F., Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2. p. 1171-1179. 1997.

EMBRAPA, Embrapa sistemas de produção 11, tecnologia de produção de soja- Região Central do Brasil -.Londrina. p. 228. 2006.

EPPEL, P.; APEL, K.; BOHLMANN, H., Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. **Plant Cell**, v. 9, n. 4. p. 509-520. 1997.

FANT, F.; VRANKEN, W.; BROEKAERT, W.; BORREMANS, F., Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by 1H NMR. **Journal Molecular Biology**, v. 279, n. 1. p. 257-270. 1998.

FERKET, K. K.; LEVERY, S. B.; PARK, C.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K., Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants resistant to antifungal plant defensins. **Fungal Genetics and Biology**, v. 40, n. 2. p. 176-185. 2003.

FRANCO, O. L.; MURAD, A. M.; LEITE, J. R.; MENDES, P. A.; PRATES, M. V.; BLOCH, C., JR., Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. **The Febs Journal**, v. 273, n. 15. p. 3489-3497. 2006.

FREITAS, T. M. Q.; MENEGHETTI, R. C.; BALARDIN, R. S., Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. **Ciência Rural**, v. 34, n. p. 991-996. 2004.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solani* f.sp. *glycines***. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, 2003.

GAO, A. G.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; WOERNER, B. M.; STARK, D. M.; SHAH, D. M.; LIANG, J. H.; ROMMENS, C. M. T., Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 12. p. 1307-1310. 2000.

GÁSPERI, A. C.; PRESTES, A. M.; COSTAMILAN, L. M., Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. p. 544-547. 2003.

GU, Q.; KAWATA, E. E.; MORSE, M. J.; WU, H. M.; CHEUNG, A. Y., A flower-specific cDNA encoding a novel thionin in tobacco. **Molecular and General Genetics**, v. 234, n. 1. p. 89-96. 1992.

HADWIGER, L. A.; CHIANG, C. C., The *Fusarium solani* induced expression of a pea gene family encoding high cysteine content proteins. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 4, n. p. 324-331. 1991.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M., Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, v. 89, n. 5. p. 503-512. 2002.

IAMAMOTO, M. M.; GOES, A.; CIA, E.; BELOT, J. L. In **Controle químico de ramulose no algodoeiro**, III Congresso Brasileiro de Algodão, Campo Grande-MS, 2001; EMBRAPA/CNPA-CPAO, U., Ed. Campo Grande-MS. , 2001; pp 625- 626

IAMAMOTO, M. M., **Doenças foliares do algodoeiro**. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia - FUNEP: Jaboticabal. , 2003.

IZADPANA, A.; GALLO, R. L., Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3. p. 381-392. 2005.

JANA, S.; DEB, J. K., Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3. p. 289-298. 2005.

JANSSEN, B. J.; SCHIRRA, H. J.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A.; CRAIK, D. J., Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. **Biochemistry**, v. 42, n. 27. p. 8214-8222. 2003.

JENNINGS, C.; WEST, J.; WAINE, C.; CRAIK, D.; ANDERSON, M., Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19. p. 10614-10619. 2001.

JIN, F.; XU, X.; WANG, L.; ZHANG, W.; GU, D., Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) in *Pichia pastoris*: purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 50, n. 2. p. 147-156. 2006.

KOBAYASHI, Y.; TAKASHIMA, H.; TAMAOKI, H.; KYOGOKU, Y.; LAMBERT, P.; KURODA, H.; CHINO, N.; WATANABE, T. X.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S.; MORODER, L., The Cystine-Stabilized Alpha-Helix - a Common Structural Motif of Ion-Channel Blocking Neurotoxic Peptides. **Biopolymers**, v. 31, n. 10. p. 1213-1220. 1991.

KOO, J. C.; CHUN, H. J.; PARK, H. C.; KIM, M. C.; KOO, Y. D.; KOO, S. C.; OK, H. M.; PARK, S. J.; LEE, S. H.; YUN, D. J.; LIM, C. O.; BAHK, J. D.; LEE, S. Y.; CHO, M. J., Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 3. p. 441-452. 2002.

KOVALSKAYA, N.; HAMMOND, R. W., Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 63, n. 1. p. 12-17. 2009.

KRISTENSEN, A. K.; BRUNSTEDT, J.; NIELSEN, J. E.; MIKKELSEN, J. D.; ROEPSTORFF, P.; NIELSEN, K. K., Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 16, n. 3. p. 377-387. 1999.

KUSHMERICK, C.; DE SOUZA CASTRO, M.; SANTOS CRUZ, J.; BLOCH, C., JR.; BEIRAO, P. S., Functional and structural features of gamma-zeationins, a new class of sodium channel blockers. **FEBS Letters**, v. 440, n. 3. p. 302-306. 1998.

LAI, F. M.; DELONG, C.; MEI, K. F.; WIGNES, T.; FOBERT, P. R., Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity. **Plant Science**, v. 163, n. 4. p. 2002.

LAY, F. T.; BRUGLIERA, F.; ANDERSON, M. A., Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3. p. 1283-1293. 2003a.

LAY, F. T.; SCHIRRA, H. J.; SCANLON, M. J.; ANDERSON, M. A.; CRAIK, D. J., The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. **Journal Molecular Biology**, v. 325, n. 1. p. 175-188. 2003b.

LI, L.; WANG, J. X.; ZHAO, X. F.; KANG, C. J.; LIU, N.; XIANG, J. H.; LI, F. H.; SUEDA, S.; KONDO, H., High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 39, n. 2. p. 144-151. 2005.

LINDER, S.; SCHLIWA, M.; KUBE-GRANDERATH, E., Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. **Biotechniques**, v. 20, n. 6. p. 980-982. 1996.

LIU, Y. J.; CHENG, C. S.; LAI, S. M.; HSU, M. P.; CHEN, C. S.; LYU, P. C., Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 63, n. 4. p. 777-786. 2006.

LOBO, D. S.; PEREIRA, I. B.; FRAGEL-MADEIRA, L.; MEDEIROS, L. N.; CABRAL, L. M.; FARIA, J.; BELLIO, M.; CAMPOS, R. C.; LINDEN, R.; KURTENBACH, E., Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. **Biochemistry**, v. 46, n. 4. p. 987-996. 2007.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M., Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4. p. 249-270. 2005.

MANDARD, N.; SY, D.; MAUFRAIS, C.; BONMATIN, J. M.; BULET, P.; HETRU, C.; VOVELLE, F., Androctonin, a novel antimicrobial peptide from scorpion *Androctonus australis*: solution structure and molecular dynamics simulations in the presence of a lipid monolayer. **Journal Biomolecular Structures & Dynamics**, v. 17, n. 2. p. 367-380. 1999.

MARCUS, J. P.; GOULTER, K. C.; GREEN, J. L.; HARRISON, S. J.; MANNERS, J. M., Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, n. 3. p. 743-749. 1997.

MCMANUS, A. M.; NIELSEN, K. J.; MARCUS, J. P.; HARRISON, S. J.; GREEN, J. L.; MANNERS, J. M.; CRAIK, D. J., MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a Greek key beta-barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, n. 3. p. 629-638. 1999.

MELO, F. R.; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; MELLO, L. V.; ARY, M. B.; GROSSI DE SA, M. F.; BLOCH, C., JR., Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling and docking. **Proteins**, v. 48, n. 2. p. 311-319. 2002.

MENGISTU, A.; PARIS, R. L., Comparison of disease assessments of soybean genotypes in the presence of charcoal rot [abstract]. **Phytopathology**, v. 93, n. p. 2003.

MIROUZE, M.; SELS, J.; RICHARD, O.; CZERNIC, P.; LOUBET, S.; JACQUIER, A.; FRANCOIS, I. E.; CAMMUE, B. P.; LEBRUN, M.; BERTHOMIEU, P.; MARQUES, L., A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. **The Plant Journal**, v. 47, n. 3. p. 329-342. 2006.

MONTESINOS, E., Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 1. p. 1-11. 2007.

MORENO, M.; SEGURA, A.; GARCIA-OLMEDO, F., Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. **European Journal Biochemistry**, v. 223, n. 1. p. 135-139. 1994.

MURAD,A.M; PELEGRINI,P.B.; NETO, SM; FRANCO, O.L., Novel Findings of Defensins and their Utilization in Construction of Transgenic Plants. **Transgenic Plant Journal**, v. 1(1), n. p. 39-48. 2007.

OSBORN, R. W.; DE SAMBLANX, G. W.; THEVISSSEN, K.; GODERIS, I.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; ATTENBOROUGH, S.; REES, S. B.; BROEKAERT, W. F., Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **FEBS Letters**, v. 368, n. 2. p. 257-262. 1995.

PANJIDEH, H.; COELHO, V.; DERNEDDE, J.; FUCHS, H.; KEILHOLZ, U.; THIEL, E.; DECKERT, P. M., Production of bifunctional single-chain antibody-based fusion proteins in *Pichia pastoris* supernatants. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 6. p. 559-568. 2008.

PATEL, S. U.; OSBORN, R.; REES, S.; THORNTON, J. M., Structural studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMP1). **Biochemistry**, v. 37, n. 4. p. 983-990. 1998.

PELEGRINI, P. B.; LAY, F. T. ; MURAD, A.M.; ANDERSON, M. A. ; FRANCO, O.L. Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. **Proteins**, v. 1, p. 1-1. 2008.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C., Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, V. 24, pp 536-547. 2004

ROMAGNOLI, S.; FOGOLARI, F.; CATALANO, M.; ZETTA, L.; SCHALLER, G.; URECH, K.; GIANNATTASIO, M.; RAGONA, L.; MOLINARI, H., NMR solution structure of viscotoxin C1 from *Viscum album* species *Coloratum ohwi*: toward a structure-function analysis of viscotoxins. **Biochemistry**, v. 42, n. 43. p. 12503-12510. 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W., **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, Vol. 2001.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2. p. 368-379. 1987.

SEGURA, A.; MORENO, M.; GARCIAOLMEDO, F., Purification and Antipathogenic Activity of Lipid Transfer Proteins (Ltps) from the Leaves of *Arabidopsis* and Spinach. **FEBS Letters**, v. 332, n. 3. p. 243-246. 1993.

SEGURA, A.; MORENO, M.; MOLINA, A.; GARCIA-OLMEDO, F., Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). **FEBS Letters**, v. 435, n. 2-3. p. 159-162. 1998.

SELITRENNIKOFF, C. P., Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7. p. 2883-2894. 2001.

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

SHARMA, P.; LONNEBORG, A., Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce. **Plant Molecular Biology**, v. 31, n. 3. p. 707-712. 1996.

SONG, X. M.; WANG, J.; WU, F.; LI, X.; TENG, M. K.; GONG, W. M., cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. **Plant Molecular Biology**, v. 57, n. 1. p. 13-20. 2005.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; GATEHOUSE, J. A.; GUPTA, V. S., A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. **Plant Molecular Biology**, v. 57, n. 3. p. 359-374. 2005.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; BENNICHT, H.; BOMAN, H. G., Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820. p. 246-248. 1981.

TAILOR, R. H.; ACLAND, D. P.; ATTENBOROUGH, S.; CAMMUE, B. P. A.; EVANS, I. J.; OSBORN, R. W.; RAY, J. A.; REES, S. B.; BROEKAERT, W. F., A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 39. p. 24480-24487. 1997.

TAVARES, L. S.; SANTOS, M. D.; VICCINI, L. F.; MOREIRA, J. S.; MILLER, R. N. G.; FRANCO, O. L., Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides**, v. 29, n. 10. p. 1842-1851. 2008.

TERRAS, F. R.; SCHOOF, H. M.; DE BOLLE, M. F.; VAN LEUVEN, F.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P.; BROEKAERT, W. F., Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 22. p. 15301-15309. 1992.

TERRAS, F. R.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; OSBORN, R. W.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P.; BROEKAERT, W. F., A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. **FEBS Letters**, v. 316, n. 3. p. 233-240. 1993.

TERRAS, F. R. G.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N. V.; OSBORN, R. W.; KESTER, A.; REES, S. B.; TORREKENS, S.; VANLEUVEN, F.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W. F., Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish - Their Role in Host-Defense. **Plant Cell**, v. 7, n. 5. p. 573-588. 1995.

THEVISSSEN, K.; GHAZI, A.; DE SAMBLANX, G. W.; BROWNLEE, C.; OSBORN, R. W.; BROEKAERT, W. F., Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25. p. 15018-15025. 1996.

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

THEVISSSEN, K.; FERKET, K. K.; FRANCOIS, I. E.; CAMMUE, B. P., Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. **Peptides**, v. 24, n. 11. p. 1705-1712. 2003.

THEVISSSEN, K.; WARNECKE, D. C.; FRANCOIS, I. E.; LEIPELT, M.; HEINZ, E.; OTT, C.; ZHRINGER, U.; THOMMA, B. P.; FERKET, K. K.; CAMMUE, B. P., Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6. p. 3900-3905. 2004.

THOMMA, B. P.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K., Plant defensins. **Planta**, v. 216, n. 2. p. 193-202. 2002.

TSCHOPP, J. F.; BRUST, P. F.; CREGG, J. M.; STILLMAN, C. A.; GINGERAS, T. R., Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 9. p. 3859-3876. 1987.

VAN DER WEERDEN, N. L.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A., The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21. p. 14445-14452. 2008.

VAN LOON, L. C., Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 9. p. 753-765. 1997.

VASSILEVA, A.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N., Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1. p. 71-80. 2001a.

VASSILEVA, A.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N., Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 1. p. 21-35. 2001b.

WANG, Y.; NOWAK, G.; CULLEY, D.; HADWIGER, L. A.; B., F., Constitutive Expression of Pea Defense Gene DRR206 Confers Resistance to Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Disease in Transgenic Canola (*Brassica napus*). **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 12, n. p. 410-418. 1999.

WANG, Y. P.; FRISTENSKY, B., Transgenic canola lines expressing pea defense gene DRR206 have resistance to aggressive blackleg isolates and to *Rhizoctonia solani*. **Molecular Breeding**, v. 8, n. 3. p. 263-271. 2001.

WANG, J. X.; ZHAO, X. F.; LIANG, Y. L.; LI, L.; ZHANG, W.; REN, Q.; WANG, L. C.; WANG, L. Y., Molecular characterization and expression of the antimicrobial peptide defensin from the housefly (*Musca domestica*). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24. p. 3072-3082. 2006.

WANG, S.; RAO, P.; YE, X., Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1. p. 79-86. 2009.

WIJAYA, R.; NEUMANN, G. M.; CONDRON, R.; HUGHES, A. B.; POLYA, G. M., Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. **Plant Science**, v. 159, n. 2. p. 243-255. 2000.

WISNIEWSKI, M. E.; BASSETT, C. L.; ARTLIP, T. S.; WEBB, R. P.; JANISIEWICZ, W. J.; NORELLI, J. L.; GOLDWAY, M.; DROBY, S., Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 4. p. 563-572. 2003.

YE, X.Y.; NG, T.B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kda protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 424-429. 2001.

YE, X.Y.; NG, T.B. A new antifungal peptide from rice beans. **The Journal of Peptide Research**, v. 60, n. 2. p. 81-87. 2002.

ZASLOFF, M., Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **PNAS**, v. 84, n. 15. p. 5449-5453. 1987.

ZASLOFF, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870. p. 389-395. 2002.

ZHOU, Q.; LI, M.; XI, T., Cloning and expression of a clamworm antimicrobial peptide perinerin in *Pichia pastoris*. **Current Microbiology**, v. 58, n. 4. p. 384-388. 2009.

ZHU, Y. J.; AGBAYANI, R.; MOORE, P. H., Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. **Planta**, v. 226, n. 1. p. 87-97. 2007.

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](#)