



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

RAQUEL DE OLIVEIRA ROCHA

EXSUDATOS DE SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]:
CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA E EFEITOS CONTRA O NEMATOIDE DAS
GALHAS *Meloidogyne incognita*

FORTALEZA

2014

RAQUEL DE OLIVEIRA ROCHA

**EXSUDATOS DE SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]:
CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA E EFEITOS CONTRA O NEMATOIDE DAS
GALHAS *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ilka Maria Vasconcelos.
Coorientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

FORTALEZA

2014

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

-
- R576e Rocha, Raquel de Oliveira.
Exsudatos de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: caracterização proteômica e efeitos contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*. / Raquel de Oliveira Rocha. – 2014.
111 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.
1. Exsudação (Botânica). 2. Soja. 3. Nematoda em plantas. I. Título.

CDD 574.192

RAQUEL DE OLIVEIRA ROCHA

**EXSUDATOS DE SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL]:
CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA E EFEITOS CONTRA O NEMATOIDE DAS
GALHAS *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

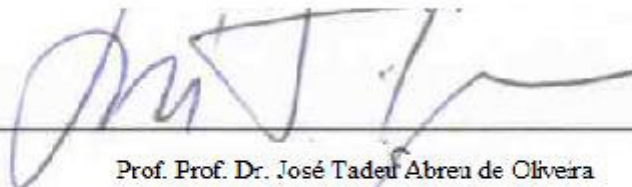
Aprovada em: 08/05/2014.

BANCA EXAMINADORA



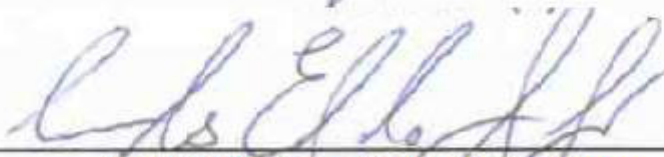
Prof. Dra. Ilka Maria Vasconcelos (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Prof. Dr. Carlos Eduardo Azevedo Sousa

Faculdade Nordeste (FANOR)

A Deus,
Aos meus pais Ricardo e Tânia,
À minha avó Mirian,
À minha irmã Rebeca
Ao meu noivo Martônio,
À minha família científica,

AGRADECIMENTO

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Ilka Maria Vasconcelos**, por sua dedicação à minha formação acadêmica durante quase 7 anos e por sua preocupação com meu bem-estar mesmo nas situações mais críticas. Muito obrigada por cada conselho dado, por cada cobrança feita e por cada palavra de força. Muita obrigada por ser meu exemplo de cientista ética e de professora extraordinária.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Hermógenes David de Oliveira**, pelos ensinamentos que me iniciaram no mundo acadêmico e pelo estímulo de sempre procurar novas ideias.

Aos professores **José Tadeu Abreu Oliveira** e **Carlos Eduardo Azevedo Souza**, por aceitarem participar desta banca.

À Dr^a. **Janne Keila Morais-Dostert**, por toda contribuição feita a este trabalho. Muito obrigada por sua paciência e compreensão durante as correções e por se manter sempre disponível a uma conversa.

Ao Dr. **Carlos Eduardo Azevedo Souza**, por sua ajuda incondicional durante as análises deste trabalho. Por cada conhecimento passado, por cada conversa estimulante, por cada conselho dado, o meu muitíssimo obrigada.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (DBBM-UFC) por todo o conhecimento transmitido em disciplinas da pós graduação. Em especial aos professores **José Tadeu Abreu de Oliveira** e **José Hélio Costa**, por cada sugestão feita a este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira** e ao Prof. Dr. **Renato de Azevedo Moreira**, por todas as discussões e sugestões geradas em torno deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Proteômicas, da Universidade de Fortaleza, coordenado pela Prof^a. Dr^a. **Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira**, pela parceria iniciada neste

trabalho. Em especial ao **Frederico Moreno** e **Marina Lobo**, muito obrigada por auxílio prestado durante às análises proteômicas.

Ao Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, coordenado pela Dr^a. **Maria Fátima Grossi de Sá**. Agradeço a Dr^a. Fátima por abrir as portas do seu laboratório e permitir a realização de experimentos de fundamental importância para conclusão desta dissertação. Agradeço também a todos os integrantes do LPP-I que tornaram minha estadia em Brasília tão produtiva e prazerosa. Em especial, muito obrigada ao Dr. **Jose Dijair A. de Souza Junior**, por sua disponibilidade e paciência durante os ensaios com nematoides.

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, dirigido pelo Prof. **José Tadeu Abreu de Oliveira**, aqui representados por **Handerson Ribeiro** e **Fredy Davi**, por terem me ajudado sempre que precisei e por me fazerem sentir parte do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, dirigido pela Prof^a. **Ana de Fátima F. Urano de Carvalho**, por sempre se mostrarem dispostos a ajudar. O meu mais sincero obrigada.

À minha família científica: **Adelina Braga, Bella Giselle, Clídia Eduarda, Henrique Pinho, Juliana Gifoni, Lucas Pinheiro, Paulo Carvalho, Vanessa de Moraes, Marina Gabrielle e Daniele Bezerra**, por toda convivência nestes vários anos de experimentos. Em especial, meu muito obrigada à **Mirella Pereira, Helen Costa e Mariana Reis**, pelas horas de desabafo, pelos lanches à tarde, pelos conselhos sempre nas horas certas, enfim, pela amizade nunca esquecida.

Aos meus pais, **Ricardo Rocha** e **Vanda Tânia**, pelo amor, acima de tudo. Por sempre acreditarem em mim e por sempre cobrarem o meu melhor. Por estarem sempre ao meu lado, apesar da distância. Amo vocês.

À minha irmã **Rebeca Rocha**, por sua leveza e espontaneidade que sempre me ajudam nas horas difíceis. Por sua companhia nas noites de insônia e por suas brincadeiras bobas que tanto me fazem rir. Por ser meu orgulho.

À minha avó **Mirian Rocha**, por me fazer mais forte, mais determinada e mais feliz. Agradeço por cada dia em que moramos juntas, por cada abraço e por cada “Eu te amo”. Valeu vizinha!!!

Ao mais novo integrante da família **Bob**, por ter tornado meus dias mais alegres, mesmo com tantas obrigações. Por sempre se manter disposto a tudo, mesmo que seja só um passeio de carro.

Ao meu noivo **Martônio Ponte**, por tudo. É impossível resumir o quanto sou agradecida por te ter em minha vida. Você é meu melhor amigo, meu pior crítico e meu porto-seguro. Obrigada por sempre se manter presente, não importa como.

Aos amigos, **Aletheia Souza, Bruno Henrique, Ícaro Rabelo, Igor Augusto, Jorge Martins, Leonardo Primo, Liana Deroci, Patrícia Pinheiro, Pedro Filho e Rafael Sousa**, por serem pessoas maravilhosas sempre presentes, mesmo que seja só para concordar em como a vida está difícil. Obrigada por toda ajuda, direta ou indireta, para a conclusão deste trabalho.

Finalmente, agradeço a Deus, por todas as pessoas maravilhosas que me ajudaram a trilhar este caminho. Por me permitir uma vida cheia de felicidade. Por cada dificuldade vencida, por cada ensinamento aprendido e por cada oportunidade vivenciada.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os ensaios experimentais que compõem esta dissertação foram realizados graças ao auxílio das seguintes instituições:

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará (DBBM-UFC).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado e de fomento à pesquisa.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela contribuição para a melhoria das condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena, which impress him like a fairy tale.”

Marie Curie (1867-1934)”

RESUMO

A exsudação é um mecanismo de defesa apresentado por sementes que consiste na liberação de moléculas para o solo durante o processo de germinação. Esses exsudatos, compostos essencialmente de proteínas e metabólitos secundários, atuam interferindo no desenvolvimento de microrganismos, representando fontes para prospecção de moléculas de defesa com potencial biotecnológico, voltadas ao controle de patógenos de solo. Nesse contexto, a soja se destaca [*Glycine max* (L.) Merrill] como sistema ideal ao estudo das interações planta-patógeno, visto seu grande valor econômico e o alto teor de proteínas de seus grãos. Este trabalho teve como objetivos caracterizar a composição dos exsudatos de sementes de dois cultivares de soja, com diferentes índices de desempenho em resposta ao nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*, e avaliar seus efeitos *in vitro* e *in vivo* sobre este fitopatógeno. Exsudatos foram obtidos a partir de sementes de soja (cultivares BRS-Pala: suscetível; BRS-Macota: resistente), embebidas em acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, por 18 horas. A análise proteômica comparativa livre de gel que permitiu a identificação de diversas proteínas relacionadas à defesa vegetal, tais como a aglutinina da soja, os inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk e proteínas relacionadas à patogênese. A análise qualitativa de metabólitos secundários nos exsudatos revelou a presença de fenóis, triterpenóides, saponinas, flavonas, flavonóis e xantonas em ambas as cultivares. Posteriormente, estes exsudatos foram dialisados em membranas de diálise com exclusão de 3,5 kDa e submetidos à dosagem de proteínas bioativas. As atividades hemaglutinante (609,52 UH/mgP), inibitórias de tripsina (4,81 mg tripsina inibida/mgP) e papaína (30,48 UI/mgP), proteolítica (1,52 UAPr/mgP.min) e β -1,3-glucanásica (58,26 η katGLU/mgP) foram maiores para a cultivar BRS-Pala. Já a atividade peroxidásica (0,218 UAP/mgP.min) predominou na cultivar BRS-Macota. A avaliação da atividade nematocida sobre ovos e juvenis de segundo estágio (J2), usando exsudatos dialisados, revelou que ambos os exsudatos são capazes de inibir a eclosão de *M. incognita*, bem como a mobilidade dos juvenis desta espécie. Esta propriedade nematostática se reflete na infectividade do parasita, reduzida pelo tratamento com proteínas exsudadas na concentração de 0,13 mg/mL. Os resultados reforçam a ideia de que a exsudação das sementes está relacionada à defesa constitutiva deste órgão vegetal, sugerindo que proteínas presentes nos exsudatos podem promover proteção contra nematoides durante o processo germinativo.

Palavras-chave: Exsudação. *Glycine max*. *Meloidogyne*. Defesa. Proteínas.

ABSTRACT

Exudation is a defense mechanism presented by seeds, which release molecules to the soil during the germination process. These exudates, mainly composed by proteins and secondary metabolites, act interfering with the development of microorganisms. They represent a source of defense molecules with biotechnological potential to control soil-borne pathogens. In this context, soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] stands as an ideal system in the study of plant-pathogen interaction due to its great economic value and the high content of seed proteins. The experimental activities presented in this thesis aimed to characterize the composition of seed exudates from two different soybean cultivars, which show different levels of performance in response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Furthermore, the *in vitro* and *in vivo* effects of the seed exudates on this pathogen were evaluated. For this purpose, the exudates were obtained from soybean seeds (BRS-Pala:susceptible; BRS-Macota:resistant), soaked in 0.1 M sodium acetate, pH 5.0, during 18 hours. The gel-free proteomic analysis allowed identification of several defense-related proteins such as soybean agglutinin, Kunitz and Bowman-Birk trypsin inhibitors, and pathogenesis-related proteins. The qualitative analysis of secondary metabolites in the exudates also revealed the presence of phenols, triterpenoids, saponins, flavones, flavonols, and xanthenes in both cultivars. The above exudates were dialyzed in 3.5 kDa cut-off membranes and assayed for bioactive proteins. The hemagglutinating (609.52 HU/mgP), trypsin (4.81 mg trypsin inhibited/mgP) and papain (30.48 IU/mgP) inhibitor, proteolytic (1.52 UAPr/mgP.min), and β -1, 3-glucanase (58.26 η katGLU/mgP) activities were higher for BRS-Pala. Otherwise, the peroxidase activity (0.218 UAP/mgP.min) predominated in BRS-Macota. The evaluation of anti-nematode activity against eggs and second stage juveniles (J2) revealed that both exudates were able to inhibit the hatching of *M. incognita* eggs as well as the J2 mobility. This nematostatic property is reflected in the infectivity of the parasite, reduced by the exuded protein at 0.13 mg/mL concentration. The results reinforce the idea that the exudation is related to the constitutive defense of the seeds, suggesting that the proteins present in the exudates can contribute to the protection against nematodes and possibly other plant enemies during the germination process.

Keywords: Exudation. *Glycine max*. *Meloidogyne*. Defense. Proteins,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Eventos observados ao longo do processo germinativo.....	20
Figura 2 -	Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp.....	24
Figura 3 -	Nematoide do gênero <i>Meloidogyne</i>	25
Figura 4 -	Sintomas da Meloidoginose.....	26
Figura 5 -	Plantas de tabaco crescidas em casa de vegetação para manutenção da infectividade dos nematoides.....	37
Figura 6 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%) das proteínas exsudadas de sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota.....	49
Figura 7 -	Mapa proteico bidimensional das proteínas exsudadas de sementes de soja - cultivares BRS-Pala e BRS-Macota.....	50
Figura 8 -	Classificação das proteínas exsudadas de sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, identificadas por LC-ESI-MS/MS.....	61
Figura 9 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Tricina-PAGE-SDS) dos exsudatos de sementes de soja – cv. BRS-Pala e BRS-Macota.....	69
Figura 10 -	Efeitos dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a eclosão de <i>M. incognita</i>	72
Figura 11 -	Efeitos dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a mobilidade de juvenis (J2) de <i>M. incognita</i>	73
Figura 12 -	Efeitos dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a mortalidade de juvenis (J2) de <i>M. incognita</i>	75
Figura 13 -	Efeito quimiostático dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre formas juvenis (J2) de <i>M. incognita</i>	76
Figura 14 -	Efeito dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a infectividade de formas juvenis (J2) de <i>M. incognita</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das cultivares de soja utilizadas.....	35
Tabela 2 – Proteínas detectadas por técnica proteômica do tipo <i>shotgun</i> (LC-ESI-MS/MS) em exsudados de sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota.....	51
Tabela 3- Predição de proteínas secretadas pelas sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, pelar via clássica, avaliadas através de três programas independentes.....	62
Tabela 4 - Predição de proteínas secretadas pelas sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, pela via não clássica, por meio do programa SecretomeP 2.0.....	66
Tabela 5 - Análise qualitativa da presença de metabólitos secundários nos exsudatos bruto e dialisado de sementes de soja – cv. BRS-Pala e BRS-Macota.....	68
Tabela 6 - Avaliação da presença de proteínas relacionadas à defesa vegetal nos exsudatos de sementes de soja – cv. BRS-Pala e BRS-Macota.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BANA:	α -N-benzoil-DL-arginina- β -nafililamida
BAPNA:	α -benzoil-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
BSA:	albumina sérica bovina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonato
DMAB:	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído
DMACA:	<i>p</i> -dimetilaminocinamalaldeído
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DTT:	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
IAA	Iodoacetamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Estratégias de defesa vegetal	18
1.1.1	<i>Exsudação em sementes</i>	19
1.2	Fitonematoides.....	22
1.2.1	<i>Métodos de controle da Meloidoginose</i>	27
1.3	Análise proteômica.....	28
1.4	Semente de soja como sistema-modelo.....	30
1.5	Justificativa.....	32
1.6	Hipótese	32
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Geral.....	33
2.2	Específicos.....	33
3	MATERIAIS.....	34
3.1	Reagentes.....	34
3.2	Materiais biológicos.....	34
3.2.1	<i>Sementes de soja.....</i>	34
3.2.2	<i>Meloidogyne incognita.....</i>	36
3.2.3	<i>Eritrócitos.....</i>	36
3.2.4	<i>Plantas de Tabaco.....</i>	36
4	METODOLOGIA.....	38
4.1	Exsudação de sementes de soja.....	38
4.1.1	<i>Dosagem de proteínas.....</i>	38
4.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida de duas fases (PAGE-SDS).....	38
4.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida de três fases na presença de tricina (Tricina-PAGE-SDS).....	39
4.5	Eletroforese bidimensional.....	39
4.5.1	<i>Eletroforese bidimensional de proteínas da cultivar BRS-Pala.....</i>	39
4.5.2	<i>Eletroforese bidimensional de proteínas da cultivar BRS-Macota.....</i>	40
4.5.3	<i>Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....</i>	40
4.6	Determinação qualitativa de metabólitos secundários.....	42

4.7	Detecção de atividades vinculadas a proteínas relacionadas à defesa vegetal.....	42
4.7.1	Atividade hemaglutinante.....	42
4.7.2	Atividade inibitória de tripsina.....	43
4.7.3	Atividade inibitória de papaína.....	43
4.7.4	Atividade proteolítica.....	44
4.7.5	Atividade peroxidásica.....	44
4.7.6	Atividade β -1,3-glucanásica.....	44
4.7.7	Atividade quitinásica.....	45
4.8	Avaliação da Atividade dos exsudatos sobre o nematoide <i>M. incognita</i>	46
4.8.1	Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>	46
4.8.2	Ensaio <i>in vitro</i> de avaliação da eclosão de <i>M. incognita</i>	46
4.8.3	Ensaio <i>in vitro</i> de avaliação da mobilidade/mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>	46
4.8.4	Ensaio <i>in vitro</i> de avaliação da atratividade de <i>M. incognita</i>	47
4.8.5	Ensaio de avaliação da infectividade de <i>M. incognita</i>	47
4.9	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS.....	49
5.1	Proteínas exsudadas de sementes de soja: teor proteico, massa molecular e ponto isoelétrico.....	49
5.2	Identificação de proteínas exsudadas por espectrometria de massas.....	49
5.3	Determinação qualitativa de metabólitos secundários.....	67
5.4	Detecção de proteínas relacionadas à defesa vegetal.....	66
5.5	Efeitos dos exsudatos de sementes sobre <i>M. incognita</i> (raça 1).....	71
5.5.1	Efeito sobre a eclosão de ovos de <i>M. incognita</i>	71
5.5.2	Efeito sobre a mobilidade/mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2).....	71
5.5.3	Efeito sobre a atratividade de <i>M. incognita</i>	74
5.5.4	Efeito sobre a infectividade de <i>M. incognita</i>	77
6	DISCUSSÃO.....	79
7	CONCLUSÃO.....	91
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	92

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Estratégias de defesa vegetal

Ao longo de sua história evolutiva, as plantas foram expostas a uma grande variedade de fatores de natureza abiótica e/ou biótica, que funcionam como adversidades prejudiciais ao crescimento, desenvolvimento e produtividade do vegetal (SOARES; MACHADO, 2007). Como uma forma de resposta às agressões, o sistema de defesa destes organismos se desenvolveu, constituindo-se em um conjunto inato de barreiras e reações complexas semelhantes ao sistema de imunidade inata dos animais, mas com cada célula responsável por sua própria defesa (MOLINA, 2003).

A associação entre o sistema defensivo do vegetal e o resultado da interação planta-patógeno se dá com base em duas respostas distintas. Em uma interação compatível, onde o hospedeiro é suscetível e o patógeno virulento, os mecanismos relacionados à proteção e combate ao organismo invasor não são acionados em tempo hábil ou não são acionados de forma alguma. Como resultado, tem-se o estabelecimento do patógeno no vegetal, com posterior aparecimento da doença no hospedeiro. Contudo, quando a interação planta-patógeno se mostra na forma incompatível, em que o hospedeiro é resistente e o patógeno avirulento, as estratégias de defesa já se mostram inatas ou são desempenhadas de modo rápido e eficiente, o que conduz à resistência (AGRAWAL, 2007).

Na defesa vegetal, outra distinção fundamental diz respeito à natureza do mecanismo. As duas principais estratégias compreendem a defesa basal e a mediada por genes R (GURURANI *et al.*, 2012). A defesa basal corresponde à primeira linha de proteção, abrangendo barreiras físicas e químicas. Pelos, espinhos, tricomas e ceras que recobrem a superfície de caules e frutos e atuam conjuntamente de modo a impedir a adesão, penetração e estabelecimento do patógeno, são elementos típicos de defesas estruturais (OLIVEIRA, 2009). Quanto à defesa química, podem ser destacadas as reações bioquímicas que ocorrem nos tecidos, as quais são responsáveis por criar condições de toxicidade ao invasor. Os constituintes dessa linha de defesa podem ser moléculas pertencentes ao metabolismo secundário do vegetal, como terpenóides, fenóis e saponinas ou mesmo ao metabolismo primário, incluindo peptídeos e proteínas (FREEMAN; BEATTIE, 2008).

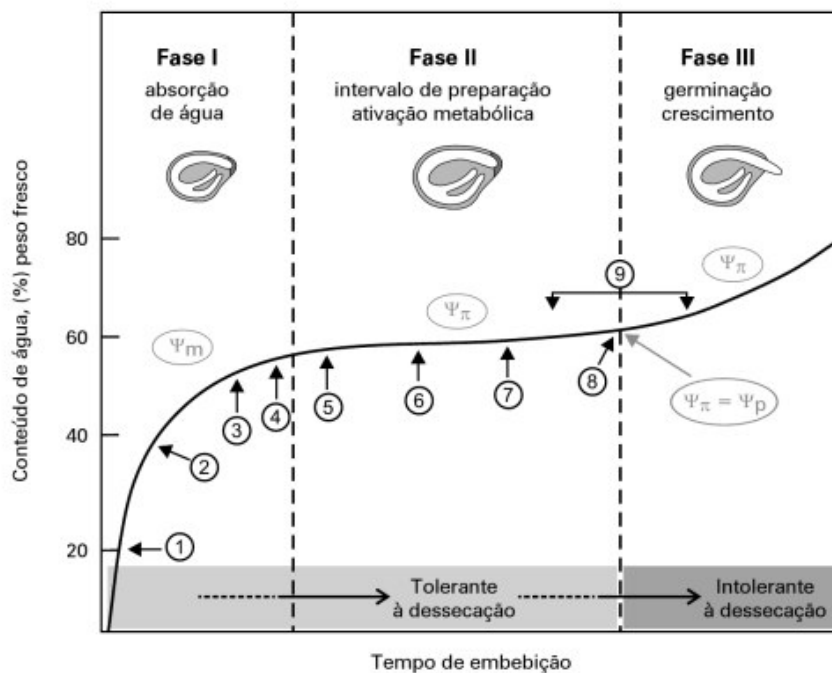
1.1.1 Exsudação em sementes

De acordo com a teoria da defesa ótima de plantas, a produção de moléculas relacionadas à proteção, por ser um processo caro ao vegetal, não se distribui igualmente em todas as suas partes (ZANGERL; BAZZAZ, 1993). Nesse contexto, estruturas vegetativas, tais como as folhas, podem ser protegidas especialmente por compostos que são induzidos, ou seja, sintetizados em resposta a um dano, visto a maior facilidade de substituição de tais órgãos e tecidos (MCKEY, 1979; STRAUSS *et al.*, 2004). No entanto, quando considerados os componentes fundamentais à perpetuação da espécie, partes envolvidas na reprodução devem ser melhor protegidas por moléculas constitutivas (HEATH, 2000).

De fato, as sementes por serem o órgão responsável pelo armazenamento da informação genética de uma nova geração, desde o desenvolvimento até a reprodução e, assim, pela propagação e sobrevivência dos vegetais e, ainda, por serem ricas em compostos de reserva, que as tornam muito atrativas aos microrganismos, se mantêm sujeitas a estratégias de defesa não-específicas e permanentes, visando à proteção da nova plântula (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; SIMÕES, 2008).

Durante sua germinação, a semente quiescente inicia o acúmulo de água por embebição, processo concluído quando ocorre o alongamento dos eixos embrionários (SCARAFONI *et al.*, 2013). Essa absorção de água pela semente madura progride ao longo de três fases germinativas ilustradas na Figura 1 (BEWLEL, 1997).

Figura 1 – Eventos observados ao longo do processo germinativo



Fonte: FERREIRA; BORGHETTI, 2004. 1. Respiração e acúmulo de ATP, 2. Síntese de mRNA e reparo de DNA, 3. Ativação de polissomos, 4. Síntese de proteínas, 5. Síntese e duplicação de DNA, 6. Início da degradação de reservas, 7. Alongamento das células da radícula, 8. Protrusão de radícula e 9. Mitose.

Durante a fase I, evento crucial para o processo de germinação, o rápido acúmulo de água leva à quebra do revestimento da semente e à liberação de compostos internos. É nessa fase, sob condições ideais, que ocorre a reativação metabólica responsável pelo início da síntese de RNA e proteínas (REUZEAU; CAVALIÉ, 1997).

Em geral, a fase I da germinação pode ser dividida em dois estágios. O primeiro envolve uma rápida absorção de água através de interações superficiais (hidratação da celulose), enquanto o segundo envolve o acúmulo linear da água associado à hidratação e estabelecimento das funções das membranas. Após atingir o nível máximo de embebição, a entrada de água para, dando início à segunda fase do processo. Neste momento, há a predominância de reações de hidrólise com mobilização de reservas e aumento da atividade respiratória. Finalmente, durante a fase III, ocorre síntese de componentes da parede celular, proteínas e ácidos nucleicos, além da protrusão da radícula. Nesse período, ocorre também liberação de metabólitos de baixo peso molecular, seguida pelo aumento dos produtos de degradação dos compostos de reserva (NELSON, 2004; SIMÕES, 2008).

Essa capacidade de liberação de compostos durante a embebição e germinação das sementes é conhecida como exsudação (NELSON, 2004). Muitos desses compostos são capazes de atuar de forma direta ou indireta nos próprios processos germinativos e/ou de desenvolvimento de uma plântula saudável (BARBOUR; HATTERMANN; STACEY, 1991). Adicionalmente, a exsudação de sementes é capaz de interferir no desenvolvimento de organismo dispostos na espermosfera, região do solo que envolve a semente (NOBREGA *et al.*, 2005; OKUBARA; PAULITZ, 2005). Essa interferência representa uma das maiores influências sobre o crescimento de microrganismos e interação planta-micróbio (NOBREGA *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, 2006; MEL'NIKOVA; OMEL'CHUK, 2009; SCARAFONI *et al.*, 2013), podendo levar a exercer efeitos quimioatrativos à microrganismos presentes no solo ou, ainda, a impedir o crescimento de patógenos e a consequente colonização da semente e da plântula (BARBOUR *et al.*, 1991).

Exsudatos de sementes são comumente associados a uma resposta inibitória sobre fungos (ROSE *et al.*, 2006; SCARAFONI *et al.*, 2013). Contudo, vários trabalhos já demonstram os efeitos de exsudatos sobre outros fitopatógenos de solo. Um exemplo é a mortalidade dos fitonematoides *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne hapla* and *Pratylenchus penetrans* causada por exsudatos de sementes de *Tagetes erecta* cv. crackerjack e *T. patula* var. polynema (RIGA; HOOPER; POTTER, 2004). Adicionalmente, exsudatos de sementes de *Raphanus sativus*, *Brassica napus* e *Sinapis alba* demonstraram efeitos prejudiciais ao

nematoide de cisto *Globodera pallida*, sugerindo o potencial de uso desses exsudatos sobre o controle de infestações causadas por fitonematoides (DOSSEY, 2010).

1.2 Fitonematoides

Nematoides são animais pertencentes ao Filo Nematoda. Constituem-se no grupo de invertebrados mais abundante do planeta, perdendo em número de espécies apenas para os artrópodes. Desse filo, menos de 50% das espécies conhecidas necessitam de plantas como fonte de nutrientes, para completar seus ciclos de vida (SANTOS; SOARES, 2011).

O parasitismo de plantas por nematoides é o maior e mais incontável estresse de natureza biótica, causando queda da produção de muitas culturas de interesse econômico (ATKINSON *et al.*, 2003). Dentre os endoparasitas sedentários, o nematoide das galhas *Meloidogyne* spp. e os nematoides de cisto *Globodera* spp. e *Heterodera* spp. destacam-se como os mais danosos às culturas de amendoim, batata, cenoura, beterraba, morango, cebola e soja, podendo, em certas ocasiões, causar perda total da produção (LUC; SIKORA; BRIDGE, 1990; EVANS; TRUDGILL; WEBSTER, 1993; QUENTIN; ABAD; FAVERY, 2013).

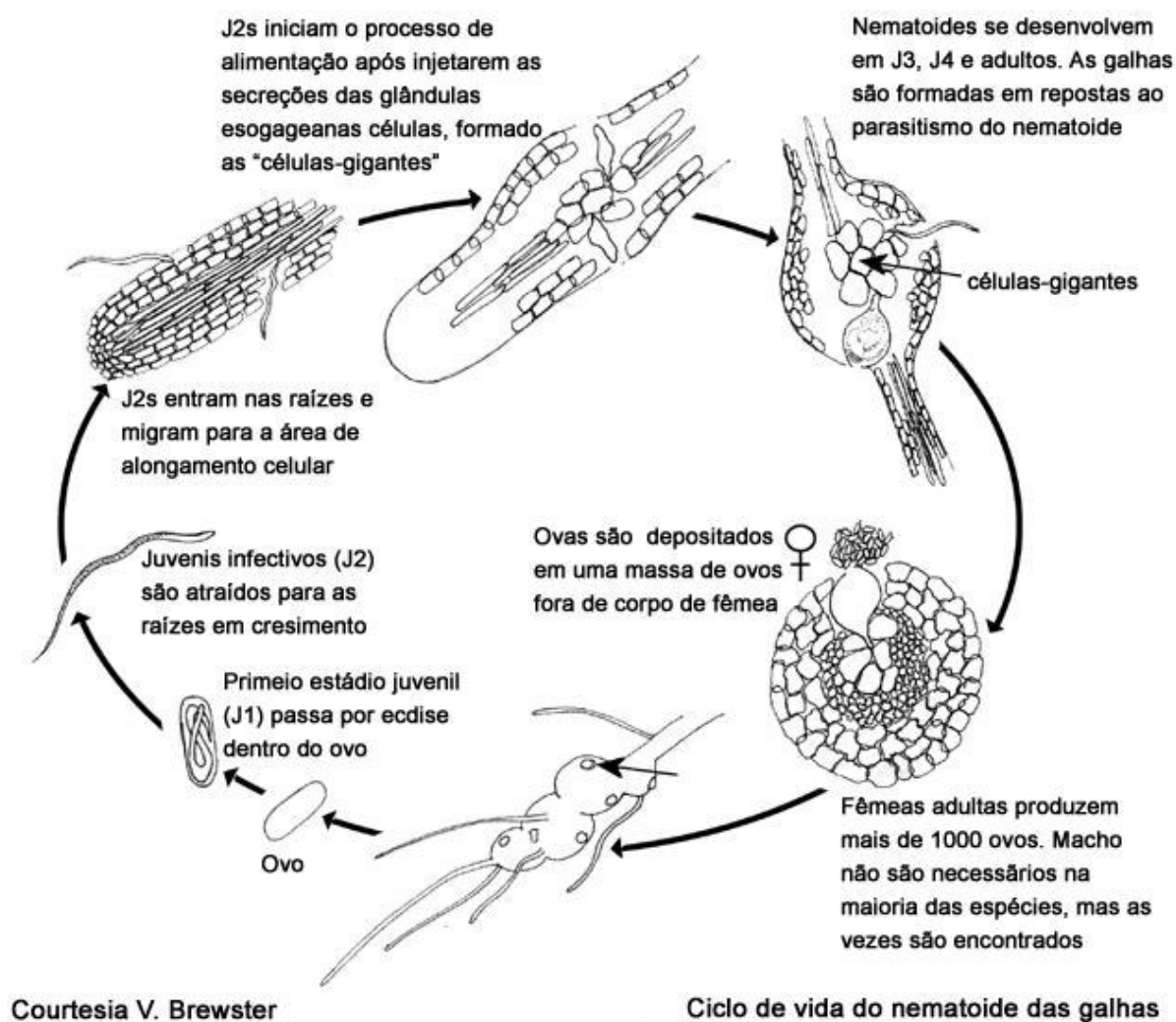
As doenças causadas pelo gênero *Meloidogyne* estão entre as mais fortemente associadas a perdas econômicas, com distribuição geográfica ampla e prejuízos crescentes (ALMEIDA *et al.*, 2005). Sete espécies são reconhecidas como representantes desse grupo de nematoides e são elas: *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. bauruensis*, *M. inornata* e *M. trifoliophila*. Segundo o *International Meloidogyne Project*, destas espécies, as quatro primeiras correspondem a 95% de todos os nematoides das galhas encontrados em zonas agrícolas (SASSER; CARTER, 1982), sendo *M. incognita* disseminada por todo o mundo, principalmente em regiões com plantio prévio de café ou algodão (SASSER, 1977).

Espécies do gênero *Meloidogyne* apresentam ciclo de vida (FIGURA 2) com seis estágios, tendo a forma juvenil extrema importância no início do parasitismo. A interação planta-patógeno ocorre quando o estágio infectivo J2, atraído por exsudatos radiculares, penetra na raiz, preferencialmente, por sua zona de alongação. A migração se dá até a escolha de um sítio de alimentação, onde ocorrerão ecdises para o desenvolvimento do adulto. Este, por sua vez, quando se torna fêmea (FIGURA 3), adquire hábito sedentário e induz o surgimento de células vegetais gigantes e multinucleadas, que servirão como fonte de nutrientes (GOVERSE *et al.*, 2000; ENGLER *et al.*, 2004). Paralelamente, células próximas da região do periciclo, córtex e parênquima vascular aumentam de volume e formam as tão características galhas (LAMBERT *et al.*, 1999). A reprodução acontece, preferencialmente,

por partenogênese com ovoposição na região perineal da fêmea. Os ovos são envoltos em uma matriz mucilaginosa e, quando eclodem, dão origem a outros J2 que iniciarão novos ciclos, podendo formar galhas nas raízes da mesma planta ou em plantas vizinhas.

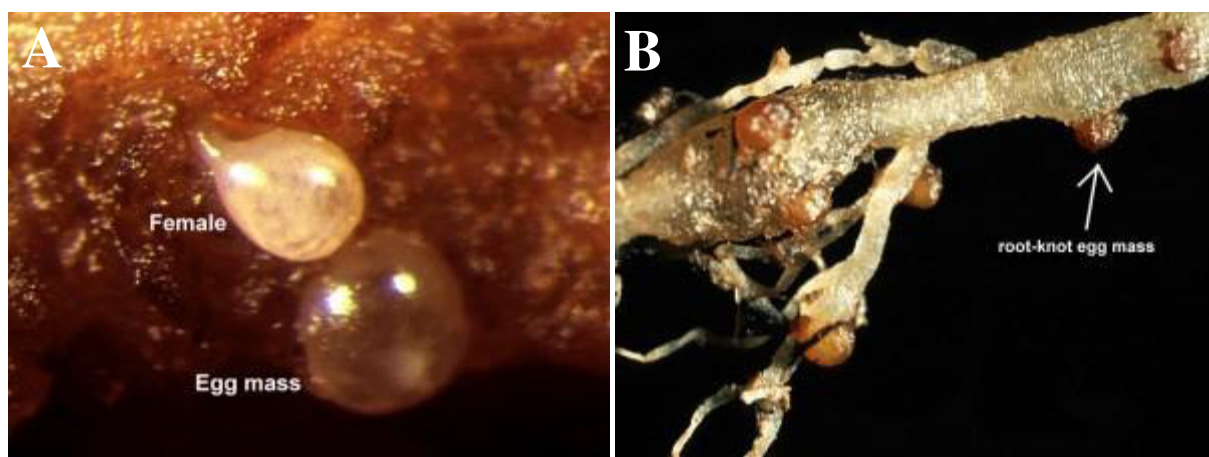
As galhas (FIGURA 4B) se constituem na alteração anatômica mais característica do parasitismo por estes organismos (LAMBERT *et al.*, 1999). Essas galhas produzem lesões irreversíveis nas raízes, prejudicando a absorção de água e nutrientes por parte da planta (GERMANI; PLENCHETTE, 2004). Conseqüentemente, outros sintomas passam a se destacar no vegetal, como folhas com manchas cloróticas, necroses entre nervuras, abortamento de vagens e, na cultura como um todo, predominância de plantas pequenas e manchas em reboleiras (DIAS *et al.*, 2010). Embora seja uma doença de difícil controle, principalmente devido à grande variedade de hospedeiros para tais patógenos, além da sua alta velocidade de reprodução, existem estratégias que visam limitar o acesso dos nematoides à cultura de interesse.

Figura 2 – Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.



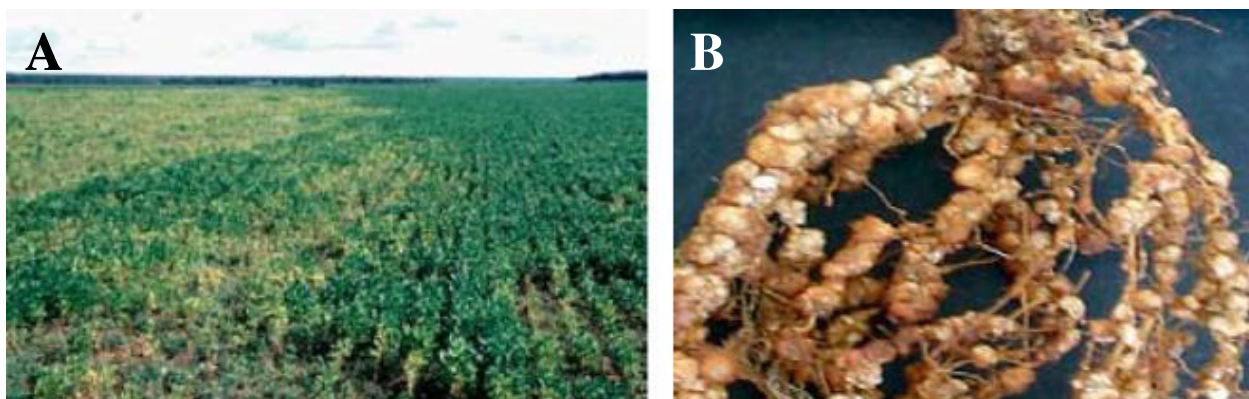
Fonte: MITKOWSKI; ABAWI, 2003.

Figura 3 – Nematóide do gênero *Meloidogyne*



Fonte: EISENBACK; ZUNKE. A. Fêmea de gênero *Meloidogyne*, B. Massa de ovos de nematóide das galhas.

Figura 4 – Sintomas da Meloidoginose



Fonte: Arquivo Embrapa soja. A. Sintoma em lavoura, B. Sintoma em raiz.

1.2.1 Métodos de controle da Meloidoginose

As medidas de controle ao nematoide das galhas se baseiam, principalmente, na sua utilização antes da sementeira, de forma a prevenir o ataque do patógeno (NATARAJAN *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2010). Existem algumas estratégias que visam limitar o acesso do nematoide à cultura de interesse, tais como: uso de defensivos agrícolas, rotação de culturas, limpeza do campo e uso de plantas resistentes, armadilha ou antagônicas (HAGAN, 1998; FERRAZ; FREITAS, 2004; HAQ *et al.*, 2004; CRISTOBAL-ALEJO *et al.*, 2006; KOMIYAMA *et al.*, 2006; BUENO *et al.*, 2007, ANDRADE, 2008).

Nos últimos anos, o método mais utilizado no controle de nematoides é a aplicação de nematicidas sintéticos (ROCHA *et al.*, 2006; ANDRÉS *et al.*, 2013). Estes podem ser divididos em dois grupos principais: os fumigantes de solo, com baixa massa molecular, e os de contato, constituídos por carbamatos ou organofosfatos (BAKKER, 1993; WHITEHEAD, 1997). Entretanto, não importa a constituição, os nematicidas sintéticos comumente apresentam desvantagens econômicas e ecológicas. Além de terem alto custo, sua toxicidade ao ambiente e aos seres vivos, o tempo de persistência no solo e a poluição ambiental gerada com seus resíduos incitam o surgimento de novas medidas de controle (JATALA, 1985; THOMASON, 1987; NOLING; BECKER, 1994; NYCZEPIR; THOMAS, 2009; SORRIBAS; ORNAT, 2011).

A utilização de cultivares resistentes pode, então, ser considerada uma das formas mais eficientes e ecologicamente corretas no combate a meloidoginose, quando comparadas à rotação de cultura e aplicação de nematicidas sintéticos. Existem hoje no Brasil cerca de 80 cultivares de soja resistentes ou moderadamente resistentes ao *M. incognita* e *M. javanica*. Quase todas estas cultivares descendem, em fonte de resistência, da cultivar norte-americana Bragg (DIAS *et al.*, 2010).

Como fatores de avaliação da resistência verificada em cultivares, destacam-se a contagem dos nematoides (ovos, juvenis e/ou adultos) na planta infectada, para determinação da sua taxa de reprodução, além da contagem de galhas radiculares, visto a existência de uma correlação positiva entre o número destas com a suscetibilidade da planta (KINLOCH, 1990; YOUNG, 1998). Contudo, a partir dessas metodologias de medida de resistência, não é possível avaliar a provável ação de genes, ou mesmo moléculas vegetais, sobre os fitonematoides. Dentre as possíveis macromoléculas, proteínas merecem destaque devido, principalmente, à potencialidade de suas aplicações na agricultura, como a produção de espécies agrícolas geneticamente melhoradas, resistentes a insetos e doenças (SHAH *et al.*,

1995). De fato, suas propriedades bioquímicas são capazes de conferir amplo espectro de atividades biológicas, permitindo que atuem como linha de frente na prevenção e combate à predação e herbivoria. Dessa forma, uma abordagem eficaz para o controle de nematoides é a identificação de proteínas ou peptídeos capazes de interferir em fases críticas do desenvolvimento do fitoparasita.

1.3 Análise proteômica

Proteínas desempenham, em todos os seres vivos, funções relacionadas à manutenção celular. Por serem as responsáveis diretas pelas características fenotípicas das células e dos indivíduos, um desequilíbrio na expressão dessas moléculas acarreta alterações na morfologia e no desenvolvimento de um dado organismo (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; ALBAN *et al.*, 2003). Nesse contexto, o proteoma, conjuntos de proteínas e suas variantes expressas por uma célula específica em resposta a um estímulo (BLACKSTOCK; MANN, 2000), mostra-se como uma coleção de informações de extrema importância na busca de compreender o funcionamento de uma organela, célula ou tecido (ONG; PANDEY, 2001).

Por sua vez, a análise proteômica consiste na investigação de processos biológicos, através de uma avaliação sistemática de propriedades específicas da expressão dessas proteínas em resposta a um evento, tais como identidade, atividade e interações moleculares (HAI; KIZILBASH; ALRUWAILI, 2013).

A análise proteômica tem se tornado uma ferramenta fundamental na caracterização dos vários papéis desempenhados pelas proteínas, principalmente após a enorme quantidade de dados de sequência gerados pelos projetos de sequenciamento dos genomas, como exemplos, aqueles envolvendo *Oryza sativa* (AGRAWAL *et al.*, 2009), *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* GENOME INITIATIVE, 2000), *Medicago trunculata* (STANTON-GEDDES *et al.*, 2013), *Nicotiana tobaccum* (RENNY-BYFIELD *et al.*, 2011) e *Glycine max* (SCHMUTZ *et al.*, 2010). Nesse contexto, ressalta-se que, por meio desse tipo de estudo, é possível se caracterizar, de forma mais detalhada, os mecanismos de resistência desencadeados em plantas sujeitas à infecção, visto à possibilidade de identificação de marcadores proteicos envolvidos nos eventos celulares decorrentes do estresse.

Diversos são os trabalhos que utilizam uma abordagem proteômica com o objetivo de caracterizar os mecanismos de defesa de vegetais frente a pragas e fitopatógenos. Fan e colaboradores (2012) identificaram 11 proteínas que sofreram alterações em seus níveis de abundância em plantas de soja, cujas folhas foram danificadas pela lagarta das folhas

(*Prodenia litura*). Dentre essas proteínas, destacam-se a fenilalanina amônia liase (PAL), responsável por fornecer precursores das rotas de produção de lignina e fitoalexinas, e S-adenosilmetionina sintetase (SAMS), enzima precursora de um importante hormônio envolvido na defesa induzida, o etileno.

A eletroforese bidimensional consiste em uma das metodologias mais utilizadas em estudos de proteômica (KOMATSU; AHSAN, 2009). Nesta técnica, as proteínas são separadas em duas dimensões, baseadas em suas propriedades físico-químicas diferentes e independentes. A primeira dimensão se caracteriza pela focalização isoelétrica (IEF), ocorrendo a separação baseada no ponto isoelétrico (pI) de cada molécula. Em seguida, a separação da segunda dimensão ocorre de acordo com a massa molecular de cada proteína, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS). Quando finalizado o procedimento, é gerado um mapa bidimensional contendo *spots* que correspondem, individualmente, a uma forma proteica, os quais podem ser excisados e identificados (WESTERMEYER, 2001).

Embora seja uma metodologia simples com geração de diversas informações referentes a cada proteína presente no mapa proteômico, a eletroforese bidimensional apresenta algumas limitações. O tempo se mostra como um dos fatores que mais prejudicam a técnica, dada à necessidade de produção de replicatas dos géis e a quantização de *spots* por avaliação de intensidade de imagem se fazem necessários para aumentar a confiabilidade das análises realizadas (MURAD; RECH, 2012). Além disso, a dificuldade de se detectar proteínas em baixas concentrações e com valores extremos de massa molecular e ponto isoelétrico pela eletroforese bidimensional justificam a escolha de outras tecnologias nas análises proteômicas.

Uma dessas tecnologias alternativas diz respeito à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com uso de amostra complexa, ou seja, uma amostra que apresenta um *pool* de proteínas não purificadas ou apenas fracionadas. Tal técnica apresenta maior sensibilidade na detecção de proteínas, principalmente quando em concentrações baixas. Adicionalmente, os processos relacionados à separação cromatográfica, determinação dos espectros de massas e pesquisa em bancos de dados podem ser realizados em poucos passos (MURAD; SINGH; YEN, 2011).

Em um experimento de proteômica se utilizando apenas da espectrometria de massas (MS) para identificação das moléculas presentes em uma amostra, as proteínas precisam ser inicialmente clivadas, uma vez que a maioria dos equipamentos de espectrometria é mais eficiente em obter sequências de peptídeos com até 20 resíduos de

aminoácidos. Proteínas podem, ainda, apresentar dificuldade de manipulação, não se mostrando solúveis em certas condições. Por estes motivos, a digestão das proteínas se faz necessária, sendo utilizada, principalmente, a tripsina, uma enzima proteolítica capaz de clivar região C-terminal da proteínas, entre resíduos de lisina e arginina (BALDWIN, 2004).

A mistura de peptídeos gerados é, então, dessalinizada, concentrada e levada a uma matriz de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Ao final da coluna cromatográfica, os peptídeos são submetidos à ionização por *electrospray* (ESI) ou à ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) para, em seguida, dar entrada no espectrômetro de massas. Atualmente, diversos são os tipos de espectrômetros de massas, todos atuando na determinação da razão m/z dos peptídeos ionizados. Não obstante, a forma como essa relação é calculada difere de um equipamento para outro (STEEN; MANN, 2004).

Uma vez dentro do sistema de vácuo, os íons dos peptídeos gerados são manipulados por meio de campos elétricos, sendo gerados espectros de massas com registros de intensidade de sinal dos íons em cada valor de uma escala m/z . Em seguida, os picos mais abundantes prosseguem na obtenção da estrutura primária dos peptídeos ionizados correspondentes por meio de espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS). Finalmente, as sequências geradas são pesquisadas em bancos de dados de modo a identificar a proteína com maior probabilidade de identidade, podendo esta ser utilizada como biomarcador, princípio ativo de produtos, dentre outras possibilidades (STEEN; MANN, 2004).

1.4 Semente de soja como sistema-modelo

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, é um dos maiores táxons botânicos de plantas superiores, compreendendo cerca de 20.000 espécies classificadas, variando entre árvores de grande porte e ervas anuais, representadas em todas as regiões temperadas e tropicais do globo (DOYLE; LUCKOW, 2003). Quando considerada a importância econômica de suas espécies, leguminosas são amplamente utilizadas como fonte de alimento, óleo, fibras, combustível, madeira, medicamentos e produtos químicos, perdendo apenas para a cultura dos cereais em área cultivada e produção total (WOJCIECHOWSKI; LAVIN; SANDERSON, 2004; GEPTS *et al.*, 2005).

Legumes também apresentam diversas características que justificam sua utilização como sistemas-modelo em pesquisas de ciência básica e aplicada e, portanto, no estudo do papel da exsudação de sementes na defesa vegetal (O'BRIAN; VANCE; VANDENBOSCH, 2009). Como fator inicial, têm-se os conhecimentos descritivos gerados por mais de 150 anos

sobre aspectos fisiológicos, bioquímicos, moleculares e genéticos do desenvolvimento de sementes dessa família (LE *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudos sobre a sinalização molecular que ocorre entre leguminosas e organismos simbiotes, polinizadores ou herbívoros sugere que espécies desta família são excelentes modelos para o estudo da interação planta-organismo, principalmente entre raízes, devido à produção substancial de fertilizantes nitrogenados, envolvendo bactérias simbiotes do gênero *Rhizobium* (JENSEN; HAUGGAARD-NIELSEN, 2003; HIRSCH, 2004; GEPTS *et al.*, 2005; O'BRIAN; VANCE; VANDENBOSCH, 2009). Por fim, a família Fabaceae é particularmente apropriada à pesquisa nas áreas de proteômica e metabolômica, pois além do sequenciamento e anotação do genoma, cada vez mais comuns em leguminosas, existe um estudo detalhado, incluindo mapas 2-D, sobre as proteínas presentes em diferentes tecidos e em diversos estágios de desenvolvimento desses vegetais (GALLARDO *et al.*, 2008). Nesse contexto, dentre as leguminosas, a subfamília Faboideae compreende a maioria das espécies modelo, incluindo o amendoim (*Arachis hypogaea*), lotus (*Lotus japonicus*), medicago (*Medicago truncatula*), feijão escarlate corredor (*Phaseolus coccineus*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*), fava (*Vicia faba*) e soja (*Glycine max*), a leguminosa mais importante economicamente no mundo (LE *et al.*, 2007). Uma das vantagens de se utilizar espécies cultiváveis como modelo de estudo da biologia da semente é a facilidade de se modificar características de importância agrônômica, como a composição de sementes, níveis de alérgenos e aumento do número e tamanho dos grãos produzidos (KINNEY, 1998; HERMAN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2006).

A soja é uma cultura que se apresenta como uma das atividades econômicas mundiais com crescimento mais expressivo nas últimas décadas. Sua ampla utilização na alimentação humana e animal, bem como na fabricação de fertilizantes e do biodiesel se justifica pelo elevado teor nutricional de seus grãos, constituídos, principalmente por 38-40% de proteínas, 30% de carboidratos e 18% de óleo (BURTON, 1997). Sementes de soja apresentam características adicionais que justificam o seu uso como sistema ideal ao estudo dos processos fisiológicos ocorrentes durante a germinação. Como já citado, a soja apresenta um elevado teor proteico em seus grãos, o que facilita a obtenção de proteínas para estudo, além das sementes não apresentarem contaminação por patógenos humanos ou animais (BOOTHE *et al.*, 2010). Adicionalmente, essas proteínas se dispõem em compartimentos de reserva especializados que proporcionam um ambiente estável a elas (JOLLIFFE; CRADDOCK; FRIGERIO, 2005; CUNHA *et al.*, 2010) que, uma vez associadas à

quiescência das sementes, ficam protegidas da degradação ou hidrólise não enzimática (MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003).

1.5 Justificativa

A exsudação é um mecanismo de defesa apresentado por sementes, que consiste na liberação de moléculas para o solo durante o processo de germinação. O exsudato, composto essencialmente de proteínas, peptídeos e metabólitos secundários, pode atuar interferindo no desenvolvimento de microrganismos, representando uma fonte de prospecção de moléculas de defesa com potencial biotecnológico para o controle de patógenos de solo.

Contudo, estudos como aqueles desenvolvidos por Santos e colaboradores (2008), que analisaram exsudatos de semente de soja e demonstraram a contribuição de proteínas na atividade de defesa vegetal, ainda são poucos.

Em uma abordagem similar, Palavalli e colaboradores (2012), através de análises proteômicas, identificaram 90 *spots* provenientes de géis bidimensionais de exsudatos de sementes de soja embebidas em água quente. Dentre as proteínas identificadas, destacaram-se a globulina 7S e o inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk como as mais proeminentes. Adicionalmente, várias outras classes de proteínas com papel reconhecido na proteção de sementes foram encontradas, tais como peroxidases e β -1,3-glucanases.

Nessa mesma temática, estudos preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA, 2009; ROCHA, 2011), acerca da composição de exsudatos de sementes de soja e de sua ação contra fitopatógenos de solo, mostraram a presença da toxina proteica *Gm-TX* (toxina de *Glycine max*), de ação deletéria para nematoides do gênero *Meloidogyne*. Tais achados, ainda que preliminares, contribuem para a compreensão do importante papel que moléculas exsudadas possam ter sobre organismos presentes no solo, incitando à busca de maiores informações nesse contexto.

1.6 Hipótese

A exsudação apresentada por sementes de soja em seu processo germinativo pode funcionar como um evento fisiológico voltado à defesa da planta contra pragas e doenças durante o processo de germinação das sementes.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar comparativamente os exsudatos de sementes de soja de duas cultivares com diferentes índices de desempenho frente ao parasitismo de *M. incognita* (BRS-Pala - suscetível; BRS-Macota - resistente), visando obter informações que venham reforçar o papel de defesa atribuído aos exsudatos vegetais.

2.2 Específicos

- Caracterizar os exsudatos quanto à presença de diferentes classes de proteínas, através de análise proteômica;
- Caracterizar os exsudatos quanto à composição de metabólitos secundários;
- Caracterizar os exsudatos quanto à presença de atividades enzimáticas e hemaglutinante relacionadas às proteínas de defesa;
- Avaliar os efeitos *in vitro* de exsudatos proteicos sobre ovos e juvenis de segundo estágio de *M. incognita*.

3. MATERIAIS

3.1 Reagentes

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), ácido tricloroacético (TCA), β -mercaptoetanol, albumina sérica bovina (BSA), *Coomassie Brilliant Blue* G-250, *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA), *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-naftilamida (BANA), 7-dimetilaminocumarina-4-ácido acético (DMACA), azocaseína, inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (tipo I-S), papaína, trizma-base, ditioneitol (DTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU). 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-propano-sulfonato (CHAPS), fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), iodoacetamida, óleo mineral, ureia, tioureia, tiras (*strips*) para focalização isoeletrica, tampão para gradiente de pH imobilizado (*IPG buffer*) 3-10, dodecil sulfato de sódio (SDS) e marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare do Brasil.

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

3.2 Materiais biológicos

3.2.1 Sementes de soja

Sementes de soja de duas cultivares com diferentes índices de desempenho ao nematoide das galhas *M. incognita*, sendo BRS-Pala a cultivar suscetível e BRS-Macota a cultivar resistente (Tabela 1), ambas não tratadas com fungicidas, foram fornecidas pela Embrapa – Fundação Pró-Sementes (Passo Fundo – RS).

Tabela 1 – Descrição das cultivares de soja utilizadas

Características	Cultivar	
	BRS-Pala	BRS-Macota
Ciclo	Médio ou semi-tardio	Precoce
Hábito de crescimento	Determinado	Indeterminado
Altura da planta	73 cm	89 cm
Hipocótilo	Verde	Roxo
Pubescência	Marrom	Cinza
Flor	Branca	Roxa
Vagem com pubescência	Marrom clara	Cinza escura
Tegumento	Amarelo	Amarelo
Hilo	Marrom	Preto imperfeito
Peso de cem sementes	15,4 g	14,8 g
Tecnologia de Produção		
Densidade (sementes aptas/m²)	25 a 30	25 a 30
Desempenho Frente à Adversidade		
Deiscência das vagens	8	9
Acamamento	8	9
Mancha olho de rã	8	8
Cancro da haste	8	8
Podridão parda da haste	8	8
Oídio	8	3
Pústula bacteriana	8	9
Mosaico comum	8	?
<i>Meloidogyne incognita</i>	3	8
<i>Meloidogyne javanica</i>	3	7
Nematoide de cisto	3	3

Fonte: FUNDAÇÃO PRÓ-SEMENTE (2010). Índices de resistência de 1 (ruim) a 9 (excelente).

3.2.2 *Meloidogyne incognita*

Nematoides juvenis de segundo estágio (J2) pertencentes à espécie *M. incognita*, raça 1, foram obtidos a partir de raízes de tomateiros, mantidos em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF).

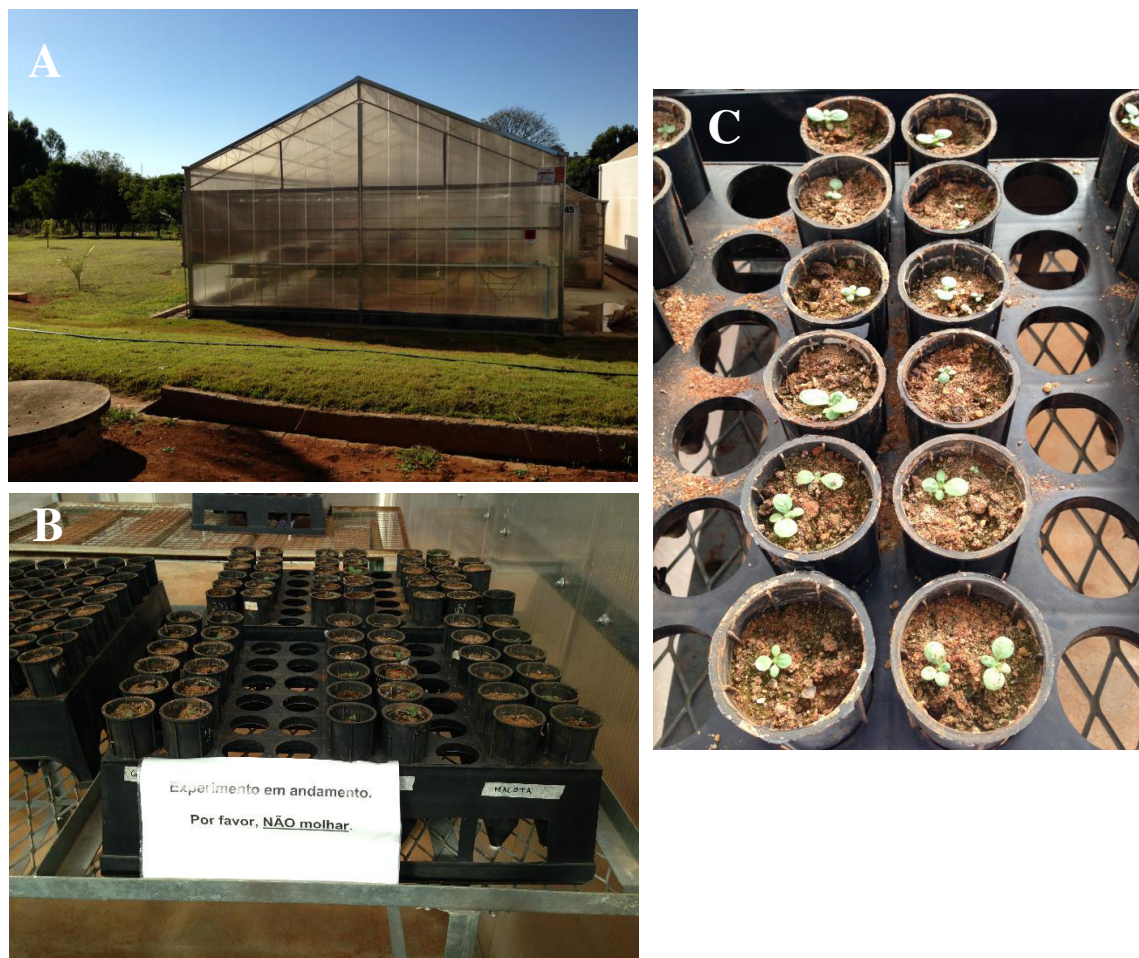
3.2.3 *Eritrócitos*

Eritrócitos foram obtidos a partir de amostras de sangue de coelho albino adulto (raça Nova Zelândia branca), mantido no biotério experimental do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2.4 *Plantas de tabaco*

Sementes de tabaco foram plantadas em tubos plásticos contendo terra e areia (2:1), sendo colocadas 3 sementes por tubo (FIGURA 5B) e deixando-se apenas uma planta por vaso após o desbaste. O plantio foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF).

Figura 5 – Plantas de tabaco crescidas em casa de vegetação para avaliação da infectividade dos nematoides



A. Casa de vegetação (Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia), B. Plantas de tabaco 15 dias após o plantio, C. Detalhe das plantas de tabaco antes do desbaste.

4. METODOLOGIA

4.1 Exsudação de sementes de soja

Para a obtenção dos exsudatos foi seguida a metodologia descrita por Santos e colaboradores (2008) e adaptada por Rocha (2011). Vinte sementes de soja, livres de danos mecânicos e sem qualquer alteração morfológica perceptível, foram embebidas em 6 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, a 28 °C e umidade relativa de 70% em câmara de B.O.D. (Quimis, Diadema, SP, Brasil) Após 18 horas, os componentes das sementes liberados para o tampão acetato, denominados exsudatos brutos, foram coletados, os teores de proteínas quantificados e analisadas para identificação das proteínas e classes de metabólitos secundários presentes.

4.2 Dosagem de proteínas

Para determinação do teor de proteínas, foi utilizado o método colorimétrico de Bradford (1976). A 100 µL de amostra, em diversas concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (tipo Novapesc II, Pharmacia) a 595 nm. A concentração proteica foi estimada utilizando-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de BSA.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida de duas fases (PAGE-SDS)

O perfil eletroforético dos exsudatos foi analisado segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Para as análises, amostras de exsudatos bruto e dialisado de ambas as cultivares foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, acrescido de SDS 1%. Posteriormente, essas mesmas amostras foram aquecidas a 100 °C durante 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g, por 5 minutos, recebendo, por fim, azul de bromofenol 0,1%. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, GE Healthcare, Uppsala, Suécia), tendo sido os géis submetidos a corrente de 20 mA/gél. Como marcadores de massa molecular foram utilizados fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida de três fases na presença de tricina (Tricina-PAGE-SDS)

O perfil eletroforético dos exsudatos foi analisado segundo metodologia descrita por Schagger e Jagow (1987), em gel de três fases, composto por um gel de concentração (4%), um gel espaçador (10%) e um gel fracionador (16,5%). O material submetido a esse tipo de eletroforese foi dissolvido em tampão de amostra Tris-HCl 0,050 M, pH 6,8, acrescido de SDS 4% e *Comassie Brilliant Blue G-250* 0,01%. Posteriormente, essas mesmas amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, GE Healthcare, Uppsala, Suécia), sendo os géis submetidos a uma corrente de 10 mA para o gel de concentração e 20 mA para os géis espaçador e fracionador. Como marcadores de massa molecular foram utilizados os mesmos descritos no protocolo anterior.

4.5 Eletroforese bidimensional

4.5.1 Eletroforese bidimensional de proteínas da cultivar BRS-Pala

A eletroforese bidimensional dos exsudatos de sementes de soja foi efetuada seguindo o protocolo descrito e modificado por Gorg *et al.* (2000). As proteínas de cada cultivar foram precipitadas com uso de kit 2D *Clean up* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Para a cultivar BRS-Pala, 250 µg das proteínas precipitadas foram ressuspensas em 250 µL de tampão de re-hidratação composto por uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 0,018 M, CHAPS 2%, IPG Buffer pH 3-10 2% (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), azul de bromofenol e solução de DeStreak (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Posteriormente, a amostra dissolvida em solução de re-hidratação foi aplicada em tira (*strip*) de 13 cm com variação linear de pH de 3 a 10, sendo deixada em repouso *overnight* (aproximadamente 12 horas). A focalização isoeétrica foi executada de acordo com os parâmetros descritos a seguir: 200 V constantes durante 90 minutos, 500 V constantes durante 60 minutos, gradiente de 1000 V durante 60 minutos, 1000 V constantes durante mais 90 minutos, gradiente de 7000 V por 120 minutos e por fim 7000 V constantes até a focalização atingir 24000 Vhr. Terminado o procedimento, a *strip* foi imersa em solução de equilíbrio (uréia 6 M, Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo primeiramente DTT (10 mg/mL) e

em seguida iodoacetamida (25 mg/mL) durante 15 minutos. A separação na segunda dimensão por PAGE-SDS (12,5%) foi conduzida de acordo com metodologia descrita por Laemmli (1970). Nessa etapa, as condições de corrida foram 250 V, 50 mA e 10 W durante 6 horas em temperatura constante de 20 °C. A coloração do gel foi efetuada utilizando Coomassie Coloidal (WANG *et al.*, 2007) e este finalmente digitalizado (*LabScan software*) e analisado utilizando o programa *PDQuest v8.0.1* (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA).

4.5.2 Eletroforese bidimensional de proteínas da cultivar BRS-Macota

A precipitação das proteínas pertencentes à cultivar BRS-Macota foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito para BRS-Pala. Para a re-hidratação da *strip*, 250 µg das proteínas precipitadas de BRS-Macota foram ressuspensas no tampão de re-hidratação agora composto por uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, IPG Buffer pH 3-10 1%, DTT 0,1 M e azul de bromofenol. Após a aplicação da amostra em *strip* de 13 cm com variação linear de pH de 3 a 10, e repouso do conjunto *overnight*, a focalização isoeletrica foi executada de acordo com as seguintes condições: 200 V constantes durante 90 minutos, 500 V constantes durante 90 minutos, gradiente de 1000 V durante 60 minutos, 1000 V constantes durante 60 minutos, gradiente de 5000 V durante 90 minutos e finalmente 5000 V constantes até a focalização atingir 32000 Vhr. Posteriormente, o equilíbrio da *strip* e a separação na segunda dimensão foram conduzidas da mesma maneira já descrita para a outra cultivar, Após a coloração do gel obtido por Coomassie Coloidal, o mesmo foi digitalizado (*LabScan software*) e analisado utilizando o programa *PDQuest v8.0.1* (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA). Para caracterização do perfil proteico das proteínas exsudadas por sementes de soja, os géis de eletroforese bidimensional foram obtidos em quadruplicata para cada cultivar.

4.5.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Amostras de proteína total contendo 50 µg, obtidas conforme já descrito, foram submetidas à digestão com tripsina. As amostras, na concentração de 1 mg/mL, diluídas em bicarbonato de amônia 0,05 M, foram reduzidas com DTT 0,01 M a 60°C e alquiladas com Iodoacetamida 0,3 M, por 30 minutos cada etapa. Em seguida, as proteínas foram adicionadas de 400 ng de tripsina (Promega, cat. # V5111, Madison, WI, USA), agitadas e incubadas a 37 °C, por aproximadamente 12 horas. A digestão foi parada com 10 µL de ácido trifluoroacético 5%, a 37 °C, por 90 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas (14000 x g, 6 °C, 30

minutos) e o sobrenadante transferido para novos microtubos. Os exsudatos digeridos foram secados à vácuo, ressuspensos em 10 μ L de acetonitrila (5%) contendo ácido fórmico (0,1%) e transferidos para os tubos de injeção (Waters, cat. # 1860385C, Milford, Massachusetts, EUA). Adicionalmente, foi utilizado um padrão interno para quantificação relativa – “*label-free*” – das proteínas encontradas na amostra (álcool desidrogenase - spiked to 50 fmol, número de acesso P00330 no SwissProt).

Os peptídeos oriundos da digestão com tripsina foram analisados por cromatografia capilar associada à espectrometria de massas (CapLC-MS/MS), utilizando um espectrômetro Synapt G2 HDMS (Waters Corp., Milford, MA, USA), conectado a uma unidade de cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) nanoACQUITY (Waters Corp., USA). Os peptídeos (1-5 μ L) foram injetados em solvente A (acetonitrila/água/ácido fórmico, 5/94,9/0,1), utilizando a bomba auxiliar da unidade UPLC para interagir com a coluna Waters Symmetry 300™ (C-18, filme de 5 μ m; 0,3 mm x 5 mm), possibilitando a dessalinização e pré-concentração. Após lavagem por 3 minutos com solvente A a 20 μ L/minuto, os peptídeos foram eluídos usando um gradiente de concentração para a coluna analítica nanoACQUITY HSS T3 (C-18 1,8 μ m, 0,075 x 200 mm). A faixa desse gradiente compreendeu 5 a 42% em solvente B (acetonitrila/água/ácido fórmico; 95/5/0,2), durante 40 minutos. O espectrômetro foi calibrado utilizando fragmentos iônicos do peptídeo Glu-1-fibrinopeptídeo B (Glu-Fib), de forma a manter a acurácia em 10 ppm.

O espectrômetro foi operado para adquirir espectros MS/MS dos peptídeos trípticos em modo MS^E, utilizando o reconhecimento de estado de carga e limite de intensidade como critérios de seleção, através do aplicativo MassLynx 4.1. De forma a serem obtidos os dados MS/MS, uma varredura (2 segundos) foi realizada nos dados de relação massa/carga (m/z) entre 400 e 1500. Todos os íons foram submetidos ao processo de dissociação induzida por colisão (CID), na presença de argônio. Os espectros iônicos resultantes (6-8 segundos) foram processados utilizando o aplicativo *Protein Lynx Global Server 2.5* e convertidos em arquivos de lista de picos (*peak list files*; PKL) para busca em bancos de dados. Para identificação das proteínas, foram feitas buscas utilizando o aplicativo *ProteinLynx Global Server 4.1*, contra o banco de dados de *Glycine max* na base de dados do UniProtKB. As buscas foram feitas utilizando os seguintes critérios: máximo de uma clivagem perdida da tripsina, peptídeos monoisotópicos, com modificação variável de oxidação da metionina e variação fixa de carbamidometilação das cisteínas. Também foram utilizados como critérios de identificação a detecção de, pelo menos, três fragmentos por peptídeo, sete fragmentos por proteína e, no mínimo, um peptídeo por proteína, além de taxas

de falso positivo abaixo de 4%. Os limites selecionados de tolerância para variação da massa dos peptídeos e dos fragmentos foram 0,3 e 0,1 Da, respectivamente. A taxa mínima de repetição considerada para cada proteína nas nove replicatas foi de 6.

4.6 Determinação qualitativa de metabólitos secundários

Para determinação qualitativa de classes de metabólitos secundários em exsudatos de sementes de soja foram utilizados os protocolos descritos por Matos (1999). Os exsudatos brutos das cultivares BRS-Pala e BRS-Macota foram diluídos em volume mínimo de álcool para realização das análises. As avaliações da presença de metabólitos secundários foram feitas para os grupos dos fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, esteróides e triterpenóides, em que todas as detecções foram baseadas na modificação ou aparecimento de coloração. Foi verificada também a presença/ausência de saponinas e alcalóides, a partir da formação ou não de espuma e precipitado, respectivamente.

4.7 Detecção de atividades vinculadas a proteínas relacionadas à defesa vegetal

Com foco na detecção de proteínas relacionadas à defesa vegetal, os exsudatos foram previamente dialisados (*cut-off* de 3,5 kDa) contra água destilada, centrifugados a 8.000 x g, por 10 minutos e as frações solúveis analisadas.

4.7.1 Atividade hemaglutinante

Para determinação da atividade hemaglutinante direta, foi seguida a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), adaptada para utilização de tubos de ensaio com solução salina como branco do ensaio. Exsudatos dialisados foram diluídos serialmente em solução salina 0,15 M e a estes acrescidos alíquotas de 200 µL de uma suspensão de eritrócitos 2% tratados ou não com tripsina, sendo, em seguida, o conjunto incubado a 37 °C. Após 1 hora, foi verificada, a olho nu, a presença ou não de aglutinados de eritrócitos. Os resultados foram expressos como o inverso da maior diluição capaz de causar aglutinação dos eritrócitos.

O tratamento enzimático das hemácias foi realizado de acordo com a técnica proposta por Lis e Sharon (1972). A suspensão de células ajustada a 2% e lavada com solução

de NaCl 0,15 M foi incubada por 1 hora, 4 °C, com a enzima tripsina, na proporção de 0,1 mg para cada 10 mL da suspensão, sendo submetida a agitações ocasionais. Após centrifugação a 3.000 x g, por 10 minutos, o pellet obtido foi submetido a novas lavagens com solução salina para retirada do excesso de tripsina.

4.7.2 Atividade inibitória de tripsina

Para detecção de inibidor de tripsina, foi utilizado o método descrito por Kakade *et al.* (1969) e modificado por Hamerstrand *et al.* (1981). Alíquotas de 10 µL dos exsudatos dialisados foram acrescidas de 1,6 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 M + CaCl₂ 0,02 M, pH 8,2, contendo tripsina (0,1 mL de solução estoque contendo 0,4 mg de tripsina em 10 mL de HCl 0,01 N) e BAPNA (3,5 mL de água e DMSO contendo 35 mg de BAPNA), como substrato. Este tampão foi também utilizado como branco do ensaio. Após 50 minutos, a reação foi interrompida com ácido acético 30% (v/v) e a leitura das absorvâncias feitas a 410 nm. Os resultados obtidos foram calculados de acordo com curva padrão obtida com o inibidor de tripsina da soja, SBTI, em diferentes concentrações e expressos como a quantidade em mg de tripsina inibida por mg de proteínas totais do exsudato.

4.7.3 Atividade inibitória de papaína

A atividade inibitória da enzima papaína foi analisada segundo metodologia descrita por Abe *et al.* (1992). Vinte microlitros de uma solução de papaína (1 mg de papaína dissolvida em água e depois diluída 50 vezes em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0), 40 µL de uma solução ativadora contendo tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0, EDTA 0,002 M e DTT 0,003 M, 240 µL de tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0, utilizado também como branco do ensaio, e 200 µL de exsudatos dialisados foram pipetados em tubos de ensaio dispostos em banho de gelo. O conjunto foi imediatamente incubado em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos. Posteriormente, foram acrescidos 200 µL do substrato BANA 0,001 M. Passados 20 minutos, a reação foi parada com 500 µL de HCl 2% diluído em etanol e o conjunto foi mantido em temperatura ambiente por mais 5 minutos. Foram, então, adicionados 500 µL do cromógeno DMACA 0,06%. A absorvância foi medida a 540 nm, 30 minutos após o acréscimo do último reagente. Uma unidade de atividade (UI) foi determinada como a quantidade de inibidor que diminuiu a atividade da protease em 0,01 da absorvância a 540 nm.

4.7.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica total dos exsudatos dialisados foi feita seguindo-se a metodologia descrita por Xavier-Filho (1989). Alíquota de 500 μL das amostras em tampão fosfato de sódio 0,025 M, pH 6,0, contendo DTT 0,003 M foi incubada por 1 hora, 37 °C, juntamente com 200 μL de azocaseína 1% (m/v). Passado o tempo de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 300 μL de ácido tricloroacético 20% (v/v) e o conjunto foi centrifugado a 10.000 x g, por 10 minutos. O tampão fosfato de sódio citado no início também foi utilizado om branco do ensaio. Ao sobrenadante contendo os peptídeos, foram adicionados 400 μL de uma solução de NaOH 2 N e a absorbância foi medida a 420 nm. A atividade foi calculada considerando-se a variação de 0,01 unidade de absorbância como sendo 1 (uma) unidade de atividade proteolítica.

4.7.5 Atividade peroxidásica

A atividade peroxidásica foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991). A 100 μL dos exsudatos dialisados, foram adicionados 500 μL de guaiacol 0,02 M (substrato doador de prótons) e 500 μL de peróxido de hidrogênio 0,06 M. A mistura foi completada com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, também utilizado como branco do ensaio, até atingir um volume final de 2 mL. O conjunto foi então incubado a 30 °C, por 10 minutos, sendo, por fim, as absorbâncias lidas a 480 nm. A variação de 1 unidade de absorbância por minuto foi assumida como sendo 1 (uma) unidade de atividade peroxidásica (1 UAPox).

4.7.6 Atividade β -1,3-glucanásica

A atividade β -1,3-glucanásica foi determinada através do método colorimétrico descrito por Boller (1993). Uma solução do substrato laminarina (2 mg/mL) em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, foi aquecida a 60 °C, por 10 minutos, e dialisada contra o mesmo tampão para remoção de glucose livre. Foram, então, adicionados 900 μL da solução de laminarina resultante a 100 μL dos exsudatos dialisados ou a 100 μL do tampão acetato de sódio 0,05 M, pH, 5,2 e os conjuntos mantidos a 30 °C, por 30 minutos. Após incubação, foi adicionado 1 mL de uma mistura de soluções (25 mL de solução “A” contendo 25 g de carbonato de sódio anidro, 25 g de tartarato de sódio potássio, 20 g de bicarbonato de sódio,

200 g de sulfato de sódio anidro e água q.s.p. 1000 mL + 1,0 mL de solução “B” contendo 15 g de sulfato de cobre hidratado, 20 µL de ácido sulfúrico concentrado e água q.s.p. 1000 mL), sendo feito, posteriormente, uma fervura em banho-maria, por 20 minutos. Após resfriamento em banho de gelo por 5 minutos, foi acrescentado 1 mL da solução “C” (3 g de arsenato de sódio + água q.s.p. 25 mL) e os tubos agitados vigorosamente até a completa remoção dos gases formados, sendo, em seguida, deixados em repouso por 5 minutos. As amostras foram então diluídas 12 vezes e a leitura das absorvâncias realizada a 520 nm. Para o cálculo do teor de açúcar a ser liberado no ensaio, uma curva padrão foi construída a partir de soluções de glucose de concentrações variando de 7,5 a 240 µg/mL em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.

4.7.7 Atividade quitinásica

A atividade quitinásica foi realizada segundo a metodologia descrita por Boller (1993), baseada na formação de *N*-acetil-D-glucosamina a partir do substrato quitina coloidal. Para tanto, 250 µL de cada exsudato dialisado foram incubados com 250 µL de quitina coloidal, a 37 °C, por 1 hora. A atividade enzimática foi interrompida com fervura em banho-maria. Após o procedimento de parada da atividade, foi feito um resfriamento em banho de gelo, sendo feita, posteriormente, uma centrifugação a 10.000 x *g*, por 10 minutos. Alíquotas de 300 µL foram retiradas e incubadas com 10 µL de uma solução contendo a enzima glucuronidase, a 37 °C, durante 1 hora.

Para determinação da *N*-acetil-D-glucosamina liberada no ensaio, 310 µL do hidrolisado obtido acima foram acrescidos de 190 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e 100 µL de solução tetraborato de sódio e potássio 0,6 M. Os tubos foram imediatamente fervidos em banho-maria e resfriados em banho de gelo. Foi, então, adicionado 1 mL da solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB). A mistura foi mantida a 37 °C em banho-maria, por 20 minutos, e as leituras de absorvância feitas em comprimento de onda de 585 nm. Para o cálculo do teor de açúcar liberado, uma curva padrão construída a partir de soluções de glucose com concentrações variando de 0,1 a 0,5 M foi construída (REISSING *et al.*, 1955).

4.8 Avaliação da Atividade dos exsudatos sobre o nematoide *M. incognita*

4.8.1 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *M. incognita*

Ovos do nematoide das galhas *M. incognita* (raça 1) foram obtidos de acordo com a metodologia proposta por Hussey e Barker (1973), com modificações. Raízes de tomateiro infectadas com o nematoide foram lavadas em água corrente e, posteriormente, fragmentadas em pedaços de aproximadamente 5 cm. As raízes foram liquidificadas em hipoclorito de sódio 0,5% e, em seguida, os ovos foram coletados em água destilada em peneiras de 500 mesh. Para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2), suspensões de ovos foram mantidas em câmara de eclosão à temperatura ambiente por 48 horas.

4.8.2 Ensaio *in vitro* de avaliação da eclosão de *M. incognita*

Para o ensaio de avaliação da eclosão dos ovos, a metodologia seguida foi baseada na proposta de Campos, Campos e Coimbra (2006), com modificações. Suspensões contendo, em média, 500 ovos de *M. incognita*, obtidos a partir da metodologia já descrita, foram colocadas em contato com amostras de exsudatos dialisados (0,5 mg/mL) durante 24 e 48 horas, a 28 °C, na ausência de luz. Após o tempo de incubação, a suspensão foi diluída em água destilada de modo a perfazer uma concentração de proteínas inócua ao juvenis, sendo estes contados apenas após 24 horas da diluição. Água foi utilizada como grupo controle negativo. Os dados obtidos foram convertidos em valores percentuais e comparados aos do grupo-controle. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8.3 Ensaio *in vitro* de avaliação da mobilidade/mortalidade de J2 de *M. incognita*

Para avaliação do efeito dos exsudatos de sementes de soja sobre a mobilidade de J2 de *M. incognita*, foi utilizada a metodologia descrita por Coimbra e Campos (2005), com modificações. Suspensões contendo, em média, 50 J2 foram colocadas em contato com amostras de exsudatos dialisados de modo a perfazer 500 µL de volume final de ensaio. O conjunto (nematoide + amostra) foi mantido a 28 °C e na ausência de luz. Como grupo controle foi utilizado água destilada e como grupos experimentais exsudatos dialisados em diferentes concentrações de proteínas (0,5; 0,25; 0,13 e 0,06 mg/mL). Os nematoides foram observados nos tempos 24 e 48 horas após incubação com a amostra, tendo sido calculado o

número de nematoides móveis (J2 com intenso movimento) e o número de nematoides imóveis. Para verificar a taxa de mortalidade, após esse período, a suspensão foi diluída de modo a perfazer uma concentração de proteínas inócua ao juvenis, sendo estes novamente contados 24 horas depois. Os dados obtidos foram convertidos em valores percentuais e comparados aos do grupo-controle. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8.4 Ensaio in vitro de avaliação da atratividade de M. incognita

Para avaliação do efeito quimiostático dos exsudatos sobre juvenis de *M. incognita* foi seguida a metodologia descrita por Wang, Lower e Williamson (2009), com adaptações. Um volume de 3 mL de Pluronic F-127 23% contendo, em média, 800 J2 foi vertido em placas de 3 cm de diâmetro, sendo estas mantidas à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, foram dispostos discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro embebidos com exsudatos dialisados (1 mg/mL) ou água no centro de cada placa. O número de nematoides presentes na área disposta a 2 mm da borda do papel filtro foram contados após 1, 3, 5 e 24 horas. Os dados obtidos foram convertidos em valores percentuais e comparados aos do grupo-controle. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8.5 Ensaio de avaliação da infectividade de M. incognita

Para avaliar o efeito das proteínas exsudadas de sementes de soja sobre a infectividade de *M. incognita*, foi utilizado o protocolo descrito por Campos, Campos e Coimbra (2006), com modificações. J2 foram mantidos em contato com água ou amostras de exsudatos (0,13 mg/mL) durante 24 horas a 28 °C e na ausência de luz. Após 24 horas de exposição aos exsudatos, os J2, na proporção 150 J2/planta, foram inoculados em raízes de tabaco crescidas por um mês. As plantas foram, então, mantidas em casa de vegetação sob condições ambientais até o 45º dia da inoculação. Após esse período, as raízes foram coletadas, lavadas e a quantificação das galhas e das massas de ovos procedida. Como replicatas, foram utilizadas 10 plantas por tratamento.

4.9 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos ensaios biológicos foi completamente aleatório. As médias obtidas nos tratamentos foram comparadas com seus respectivos controles, sendo a análise dos dados feita através dos testes não paramétricos da mediana e de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, com nível de significância 5% (*software* JMP 5.1), e a medida de dispersão calculada com base no erro padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Proteínas exsudadas de sementes de soja: teor proteico, massa molecular e ponto isoelétrico

A embebição de sementes de soja promoveu a liberação de diversos tipos de moléculas em meio tamponado, incluindo proteínas, com um pico de exsudação proteica alcançado 18 horas após contato com o tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Os maiores valores de proteínas solúveis exsudadas foram 0,260 e 0,055 mg/semente para as cultivares BRS-Macota e BRS-Pala, respectivamente.

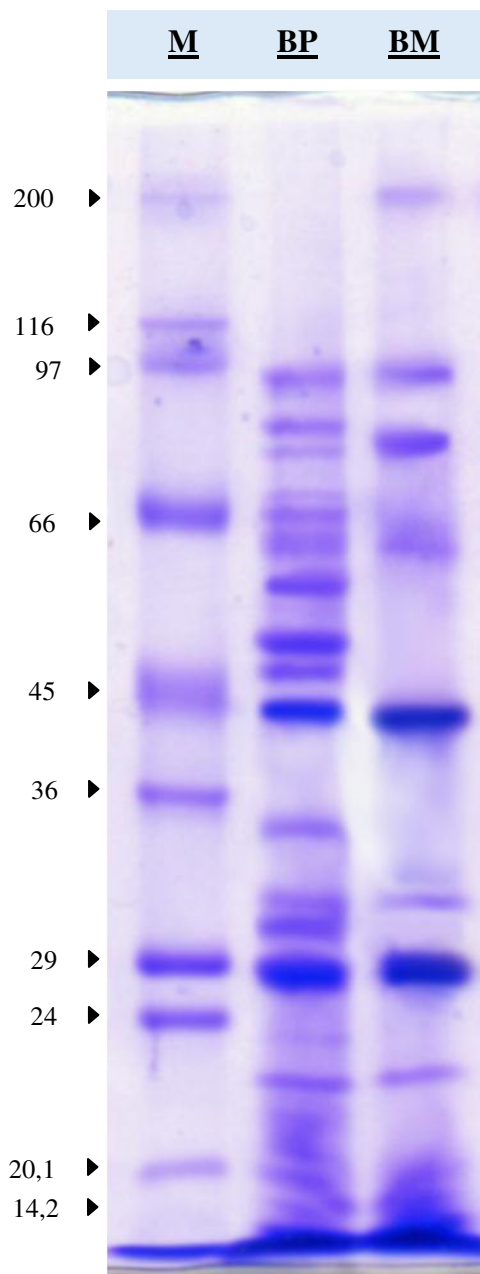
As proteínas exsudadas foram, então, analisadas por meio de eletroforeses uni- e bidimensionais. A análise dos géis de eletroforese unidimensional dos exsudatos de cada cultivar revelou diferenças quanto à diversidade de proteínas distribuídas entre massas moleculares de 200 a 14 kDa. Por PAGE-SDS, o perfil eletroforético da cultivar BRS-Pala revelou uma maior variedade de bandas quando comparado ao de BRS-Macota (FIGURA 6).

Padrões semelhantes de diversidade proteica foram também observados em géis de eletroforese bidimensional. Em BRS-Pala, foram detectados 146 *spots*, distribuídos da seguinte forma: 57 *spots* com pI entre 3,0 e 5,0; 56 *spots* com pI entre 5,0 e 7,0 e 33 *spots* com pI entre 7,0 e 10,0, cujas massas moleculares variaram de 13,0 a 81,6 kDa. Quanto a cultivar BRS-Macota, os 89 *spots* detectados se distribuíram da seguinte maneira: 44 *spots* com pI entre 3,0 e 5,0; 17 *spots* com pI entre 5,0 e 7,0 e 28 *spots* com pI entre 7,0 e 10,0, com massas moleculares variando de 12,7 a 84,6 kDa (FIGURA 7).

5.2 Identificação de proteínas exsudadas por espectrometria de massas

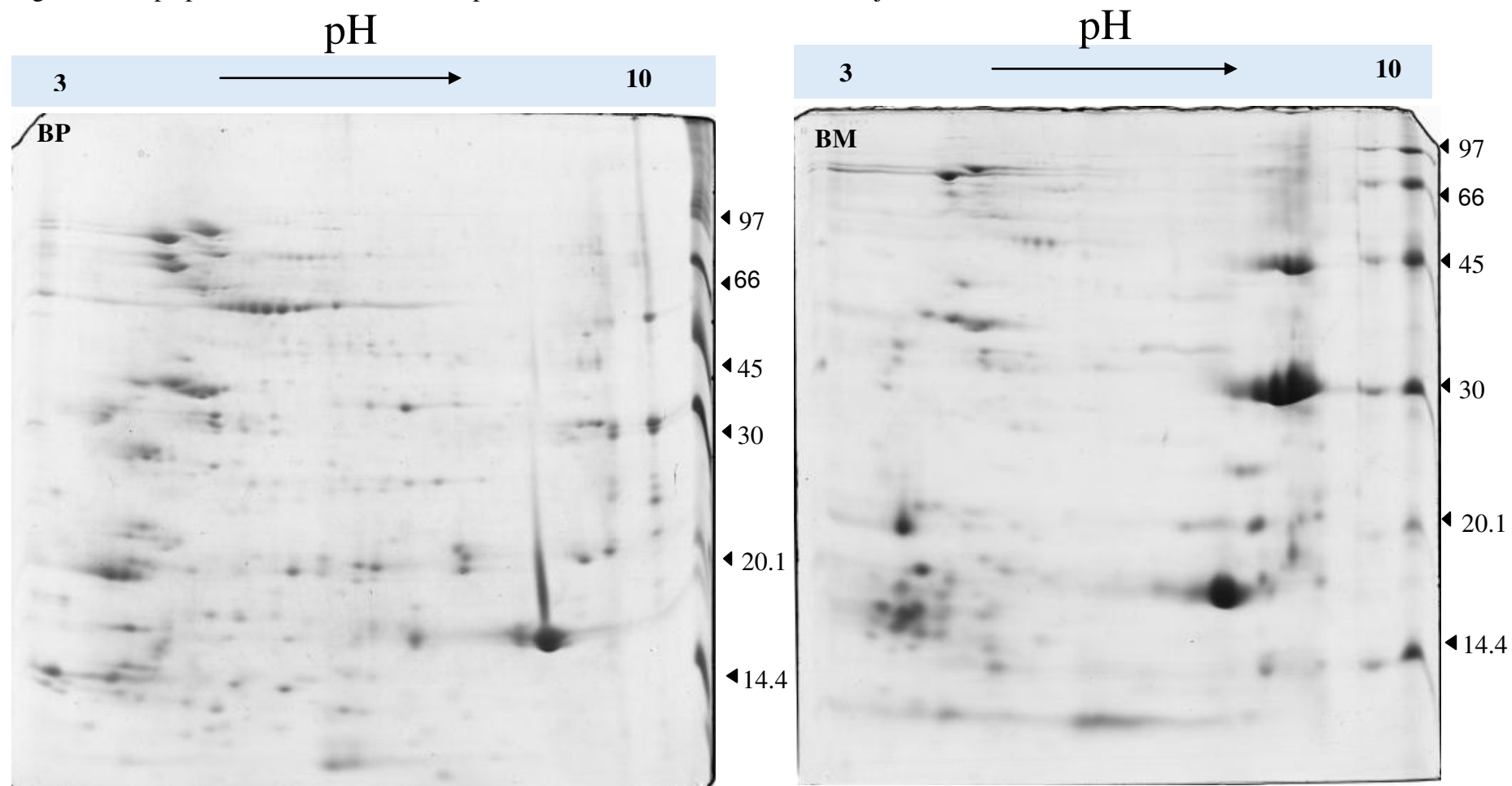
O prosseguimento da caracterização dos proteomas dos exsudatos de sementes de soja foi dado através da espectrometria de massas da amostra complexa. Um total de 64 proteínas (Tabela 2) foram identificadas com base nas sequências depositadas no banco de dados UniprotKb. Deste total, apenas 3 proteínas se mostraram específicas a uma das cultivares, dentre elas uma não caracterizadas, específica a cultivar BRS-Macota e uma não caracterizada, além de uma subunidade alfa de uma β -conglucina, únicas à cultivar BRS-Pala. Nessa mesma tabela também constam as quantidades relativas de 29 proteínas obtidas por técnica “*label-free*”, sendo 23 mais expressas em BRS-Pala em contraste àquelas 5 mais expressas por BRS-Macota.

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%) das proteínas exsudadas de sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota



(M) Marcador; (BP) Exsudato de sementes cv. BRS-Pala - 25 μ g e (BM) Exsudato de sementes cv. BRS-Macota - 25 μ g. Como marcadores de massa molecular (raia M) foram utilizados 7 μ L de *Molecular Weight Marker*[®] (Sigma-Aldrich). As massas dos marcadores são mostradas em kDa.

Figura 7 - Mapa proteico bidimensional das proteínas exsudadas de sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota



(BP) Exsudato de sementes cv. BRS-Pala - 250 μ g; (BM) Exsudato de sementes cv. BRS-Macota - 250 μ g. Como marcadores de massa molecular foram utilizados 5 μ L de *LMW-SDS Marker Kit*[®] (GE Healthcare). As massas dos marcadores são mostradas em kDa.

Tabela 2 - Proteínas detectadas por técnica proteômica do tipo *shotgun* (LC-ESI-MS/MS) em exsudados de sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota

Proteína	Acesso (UniProtKB)	Entrada	Massa Molecular Média (DA)	Escore		Razão Pala/Macota ^a
				BRS-Pala	BRS-Macota	
Putative uncharacterized protein OS <i>Glycine max</i> PE 2 SV 1 [88% homology with β -glucosidase 44-like protein (<i>Phaseolus vulgaris</i>)]	C6TNP0_SOYBN	C6TNP0	57854,09	1886,93	927,24	1
Hydrophobic seed protein OS <i>G.</i> <i>max</i> PE 1 SV 1	HPSE_SOYBN	P24337	8358,90	10225,60	8483,87	3
*Uncharacterized protein OS <i>G.</i> <i>max</i> GN Gma 8529 PE 4 SV 1 [94% homology with seed maturation protein PM24 (<i>G. max</i>)]	I1LE41_SOYBN	I1LE41	26239,05	1202,05	2120,43	0,7
* <i>Bowman-Birk</i> type proteinase inhibitor D II OS <i>G. max</i> PE 1 SV 2	IBBD2_SOYBN	P01064	9467,83	43752,51	51149,42	0,87
*Seed maturation protein PM28 OS <i>G. max</i> GN PM28 PE 4 SV 1	Q9XES8_SOYBN	Q9XES8	9512,27	3230,85	5872,32	0,91
*Uncharacterized protein OS <i>G.</i> <i>max</i> GN Gma 52712 PE 2 SV 1	C6T588_SOYBN	C6T588	16760,83	1757,65	3196,31	0,95

[88% homology with PR10-like protein (<i>G. max</i>)]						
*Basic 7S globulin OS <i>G. max</i> GN BG PE 1 SV 2	7SB1_SOYBN	P13917	46393,21	55389,76	41844,54	0,99
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 40006 PE 4 SV 1						
C6T0L2_SOYBN	C6T0L2	11141,08	8993,93	13430,57	1,03	
[88% homology with Em protein (<i>G. max</i>)]						
Basic 7S globulin 2 OS <i>G. max</i> PE 1 SV 1	7SBG2_SOYBN	Q8RVH5	47205,11	34632,34	30125,99	1,05
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 37167 PE 4 SV 1						
I1L957_SOYBN	I1L957	48795,62	2109,15	2093,62	1,07	
[76% homology with late embryogenesis abundant protein (<i>G. max</i>)]						
Em protein OS <i>G. max</i> PE 4 SV 1	P93165_SOYBN	P93165	11491,34	15633,56	14131,51	1,08
Chitinase class I OS <i>G. max</i> GN Chia1 PE 2 SV 1						
Q9SDY6_SOYBN	Q9SDY6	34341,45	1496,48	1132,50	1,15	
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> PE 4 SV 1						
I1K6M2_SOYBN	I1K6M2	23812,87	11258,69	8473,55	1,15	
[90% homology with protein P21 (<i>G. max</i>)]						
Napin type 2S albumin 1 OS <i>G. max</i> GN Gma 52474 PE 2 SV 1	Q9ZLNZ4_SOYBN	Q9ZLNZ4	17834,76	12450,66	11400,98	1,19

Trypsin inhibitor A OS <i>G. max</i> GN KTI3 PE 1 SV 2	ITRA_SOYBN	P01070	24005,35	17231,35	14694,53	1,19
24 kDa protein SC24 OS <i>G. max</i> GN Gma 2073 PE 2 SV 1	Q8W0V9_SOYBN	Q8W0V9	24569,62	15965,57	14587,67	1,2
Lectin OS <i>G. max</i> GN LE1 PE 1 SV 1	LEC_SOYBN	P05046	30928,02	5862,31	3312,66	1,27
Lipoxygenase OS <i>G. max</i> PE 3 SV 1	B3TDK5_SOYBN	B3TDK5	96726,37	3055,39	1349,94	1,28
2S albumin OS <i>G. max</i> PE 1 SV 2	2SS_SOYBN	P19594	18460,09	14237,19	6931,60	1,3
Seed maturation protein PM21 OS <i>G. max</i> GN PM21 PE 4 SV 1	Q9S7N8_SOYBN	Q9S7N8	10060,91	4080,48	4712,02	1,3
Alpha subunit of beta conglycinin fragment OS <i>G. max</i> PE 2 SV 1	Q9FZP9_SOYBN	Q9FZP9	65142,74	5475,75	4297,96	1,34
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 13341 PE 4 SV 1 [56% homology with Kunitz trypsin inhibitor (<i>G. soja</i>)]	I1KYW9_SOYBN	I1KYW9	23460,23	4436,71	3762,62	1,35
Lipoxygenase OS <i>G. max</i> GN Lx3 PE 3 SV 1	B3TDK6_SOYBN	B3TDK6	96768,30	2727,15	2009,12	1,45
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 20455 PE 4 SV 1	I1LQR8_SOYBN	I1LQR8	26260,07	1796,81	689,50	1,63

[81% homology with osmotin-like protein (<i>P. vulgaris</i>)]						
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 26853 PE 4 SV 1	I1NGF5_SOYBN	I1NGF5	47229,381	8818,34	5685,22	1,65
*Lipoxygenase OS <i>G. max</i> GN Gma 45568 PE 3 SV 1	I1KUQ0_SOYBN	I1KUQ0	96743,76	498,15	216,81	2,18
*Glycinin G1 OS <i>G. max</i> GN GY1 PE 1 SV 2	GLYG1_SOYBN	P04776	55706,47	32333,35	10533,22	2,34
*Glycinin G2 OS <i>G. max</i> GN Gy2 PE 1 SV 2	GLYG2_SOYBN	P04405	54390,90	13672,69	5206,19	2,56
*Glycinin G4 OS <i>G. max</i> GN GY4 PE 1 SV 1	GLYG4_SOYBN	P02858	63587,25	13377,09	2914,79	2,8
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 23371 PE 4 SV 1 [93% homology with late embryogenesis abundant protein (<i>Vigna radiata</i>)]	I1N2Z5_SOYBN	I1N2Z5	12246,37	x	4487,74	
β -conglycinin alpha subunit OS <i>G.</i> <i>max</i> PE 2 SV 1	Q948X9_SOYBN	Q948X9	72475,49	4768,02	x	
Putative uncharacterized protein OS <i>G. max</i> PE 2 SV 1 [59% homology with alpha-	C6SY93_SOYBN	C6SY93	22875,81	1738,61	x	

amylase/subtilisin inhibitor (<i>Medicago truncatula</i>)]					
7S storage protein alpha subunit OS <i>G. max</i> PE 2 SV 1	Q39816_SOYBN	Q39816	27367,78	3554,79	3101,62
β -conglycinin beta subunit OS <i>G.</i> <i>max</i> GN CG beta 2 PE 4 SV 1	F7J077_SOYBN	F7J077	50441,93	8815,38	5685,22
<i>Bowman-Birk</i> proteinase inhibitor fragment OS <i>G. max</i> PE 2 SV 1	Q9SBA9_SOYBN	Q9SBA9	4530,20	9679,02	12206,59
<i>Bowman-Birk</i> type proteinase inhibitor C II OS <i>G. max</i> PE 1 SV 2	IBBC2_SOYBN	P01063	9201,38	27008,52	31689,57
Dehydrin OS <i>G. max</i> GN lea D 11 PE 4 SV 1	Q70EL8_SOYBN	Q70EL8	23733,70	1902,39	4830,73
Endo-1-3- β glucanase OS <i>G. max</i> PE 2 SV 1	Q6S9W0_SOYBN	Q6S9W0	36603,47	3032,81	2145,73
Glycinin A3B4 subunit OS <i>G. max</i> PE 1 SV 1	Q7GC77_SOYBN	Q7GC77	58187,45	2968,14	1607,43
Glycinin OS <i>G. max</i> GN A5A4B3 PE 2 SV 1	Q9SB11_SOYBN	Q9SB11	63797,44	14272,56	4723,42
Glycinin OS <i>G. max</i> GN Gy4 PE 4 SV 1	Q43452_SOYBN	Q43452	63876,57	14271,15	4707,08

Hydrophobic seed protein fragment OS <i>G. max</i> PE 4 SV 1	Q3HM29_SOYBN	Q3HM29	12351,51	10225,60	8483,87
Kunitz trypsin inhibitor 3 OS <i>G. max</i> PE 4 SV 1	Q9LD16_SOYBN	Q9LD16	24067,35	11070,21	8807,75
Kunitz type trypsin inhibitor KTI1 OS <i>G. max</i> GN KTI1 PE 2 SV 1	KTI1_SOYBN	P25272	22546,00	5603,17	4081,71
Lipoxygenase OS <i>G. max</i> GN LOX9 PE 2 SV 1	A7LCD5_SOYBN	A7LCD5	96354,86	244,11	230,52
Lipoxygenase OS <i>G. max</i> GN Lx1 PE 3 SV 1	D6PAW4_SOYBN	D6PAW4	58470,52	1718,84	1325,15
Lipoxygenase OS <i>G. max</i> GN lox2 PE 2 SV 1	Q39870_SOYBN	Q39870	97265,94	3055,39	1349,94
Lipoxygenase OS <i>Glycine max</i> PE 2 SV 1	Q43438_SOYBN	Q43438	94913,13	496,96	311,50
P24 oleosin isoform A OS <i>G. max</i> PE 2 SV 2	OLEO1_SOYBN	P29530	23501,69	1396,25	1267,68
Protein P21 OS <i>G. max</i> PE 1 SV 1	P21_SOYBN	P25096	21462,86	4481,12	3240,20
Putative dehydrin fragment OS <i>G. max</i> GN lea8 PE 4 SV 1	Q5K3Q9_SOYBN	Q5K3Q9	20395,17	1840,58	4827,95
Putative uncharacterized protein OS	C6TB67_SOYBN	C6TB67	22986,45	279,47	756,28

<i>G. max</i> PE 2 SV 1						
[50% homology with Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1 (<i>G. max</i>)]						
Seed biotin containing protein						
SBP65 OS <i>G. max</i> GN SBP65 PE 1 SV 1	SBP65_SOYBN	Q39846	67878,09	616,55	296,10	
Seed maturation protein PM22 OS <i>G. max</i> GN PM22 PE 2 SV 1						
	Q9XER5_SOYBN	Q9XER5	16688,38	5253,49	6171,32	
Putative uncharacterized protein OS <i>G. max</i> PE 2 SV 1						
[99% homology with β -conglycinin, beta chain (<i>G. max</i>)]						
	C6T9L1_SOYBN	C6T9L1	50564,05	7708,77	5165,62	
Seed maturation protein PM30 OS <i>G. max</i> GN PM30 PE 2 SV 1						
	Q9XET0_SOYBN	Q9XET0	15097,41	7151,64	2766,70	
Seed maturation protein PM41 OS <i>G. max</i> GN PM41 PE 4 SV 1						
	Q9SWB2_SOYBN	Q9SWB2	8177,91	4576,94	3858,87	
Trypsin inhibitor B OS <i>G. max</i> PE 1 SV 1						
	ITRB_SOYBN	P01071	20040,66	8585,66	8243,17	
Uncharacterized protein fragment OS <i>G. max</i> PE 4 SV 1						
	I1KG87_SOYBN	I1KG87	84869,85	490,15	273,21	

Uncharacterized protein OS <i>G. max</i>					
GN Gma 308 PE 4 SV 1	I1JW44_SOYBN	I1JW44	46958,20	1290,34	1050,53
[90% homology with Aspartic proteinase nepenthesin-1-like protein (<i>P. vulgaris</i>)]					
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i>					
GN Gma 51594 PE 4 SV 1	I1M099_SOYBN	I1M099	31437,87	2280,97	6420,84
[76% homology with proline-rich protein (<i>P. vulgaris</i>)]					
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i>					
GN Gma 56611 PE 4 SV 1	I1N2Y9_SOYBN	I1N2Y9	26078,60	138,91	121,03
[50% homology with transcription factor HBP-1b, putative (<i>Ricinus communis</i>)]					
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i>					
GN Gma 8528 PE 4 SV 1	I1INGG4_SOYBN	I1INGG4	26058,11	2406,17	1643,04
[98% homology with seed maturation protein PM25 (<i>G. max</i>)]					
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i>					
PE 4 SV 1	I1LZD3_SOYBN	I1LZD3	38480,34	812,18	1152,42

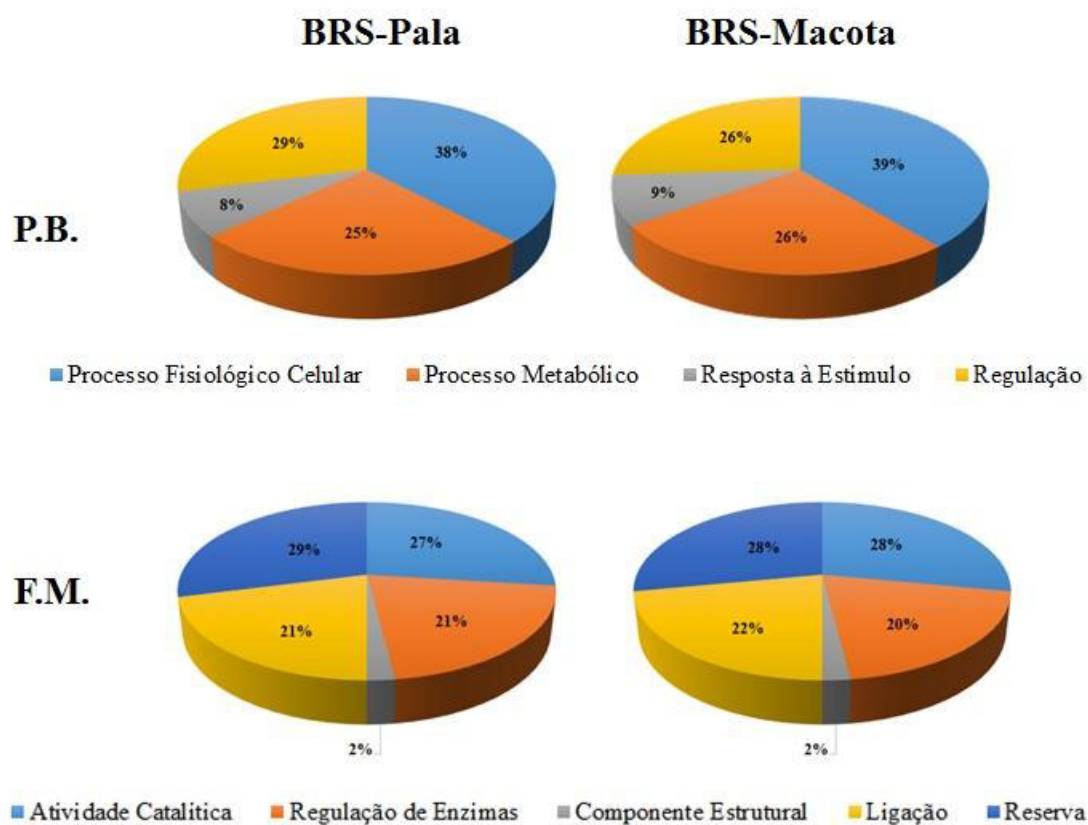
A pesquisa de proteínas foi executada com o servidor global Proteína Lynx (v. 2.4) contra entradas de *Glycine max* a partir do banco de dados SwissProt. (a) A quantificação “label-free” das proteínas foi realizada de acordo com técnica descrita por Silva e colaboradores (2006), a partir do cálculo de um fator de resposta de sinal (contagem/mol de proteína). (*) Proteínas mais expressas, em relação ao padrão interno, por cada uma das cultivares.

Na tentativa de entender a função de cada proteína na exsudação de sementes de soja, os acessos listados na Tabela 2 foram analisados por meio do *software Strap*, um aplicativo de código aberto para anotação de proteínas (BATHIA *et al.*, 2009). Os termos “*Gene Ontology*” relacionados aos atributos de cada proteína foram obtidos a partir das bases de dados UniProtKB e EBI GO e organizados na Figura 8. Discrepâncias elevadas não foram observadas entre os grupos de cada cultivar.

Dentre os processos biológicos designados aos acessos dispostos, relacionados aos exsudatos de soja, o mais ressaltado foi caracterizado como processo fisiológico celular, representado, principalmente, por lipoxigenases. Por sua vez, as funções moleculares encontradas para descrever cerca de 75% das proteínas identificadas pela espectrometria de massas foram atividade catalítica, regulação de enzimas, componente estrutural, ligação e reserva.

Quanto à localização dos componentes celulares, este critério apenas foi possível de ser aplicado a 6 proteínas de todas as que foram listadas, sendo elas componentes do núcleo, citoplasma, membrana plasmática e meio extracelular. Dentre estes grupos, o último deve ser destacado, sendo composto particularmente por inibidores de protease do tipo Bowman-Birk. Para melhorar a validação da localização celular das proteínas identificadas, além de caracterizar o secretoma de sementes de soja sujeitas à embebição, três programas independentes TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; EMANUELSSON *et al.*, 2000), iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>; BANNAI *et al.*, 2002) e SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>; BENDTSEN *et al.*, 2004) foram utilizados para identificação de sequências codificadoras de exportação celular por via clássica, ou seja, via peptídeo sinal na porção N-terminal de cada proteína. A partir de 60 sequências FASTA obtidas no banco de dados UniProtKB, das proteínas identificadas em exsudatos de soja, 29 apresentaram predição de peptídeo sinal por, pelo menos, dois dos programas listados (TABELA 3). O restante das proteínas ainda foi analisado pelo programa SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>; BENDTSEN *et al.*, 2004), para predição de sequências peptídicas de moléculas a serem secretadas por via não tradicional. No total, 6 sequências obtiveram NN-escore, ou um escore SecP, maior que 0,5, o que indica a possível secreção (TABELA 4). Dentre estas proteínas, destacam-se os inibidores de protease do tipo Bowman-Birk, previamente descritos como parte do meio extracelular e das proteínas relacionadas à maturação da semente.

Figura 8 – Classificação das proteínas exsudadas de sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, identificadas por LC-ESI-MS/MS



Os dados foram analisados utilizando o *software* para a pesquisa de anotações de proteínas Strap. Os termos “*Gene Ontology*” relacionados aos atributos de cada proteína foram obtidos a partir das bases de dados UniProtKB e EBI GO. P.B. - Processo biológico; F.M. - Função molecular.

Tabela 3 – Predição de proteínas secretadas pelas sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, pelar via clássica, avaliadas através de três programas independentes

Proteína	Acesso (UniProtKB)	Entrada	Targetp	Signalp 3.0	Ipsort
Putative					
uncharacterized protein OS <i>G. max</i> PE 2 SV 1	C6TNP0_SOYBN	C6TNP0	X	X	X
*Hydrophobic					
seed protein OS <i>G.max</i> PE 1 SV 1	HPSE_SOYBN	P24337		X	X
Basic 7S globulin					
OS <i>G. max</i> GN BG PE 1 SV 2	7SB1_SOYBN	P13917	X	X	X
Basic 7S globulin 2					
OS <i>G. max</i> PE 1 SV 1	7SBG2_SOYBN	Q8RVH5	X	X	X
Chitinase class I					
OS <i>G.max</i> GN chia1 PE 2 SV 1	Q9SDY6_SOYBN	Q9SDY6	X	X	X
Uncharacterized					
protein OS <i>G. max</i> PE 4 SV 1	I1K6M2_SOYBN	I1K6M2	X	X	X
Napin type 2S					
albumin 1 OS <i>G.cmax</i> GN Gma 52474 PE 2 SV 1	Q9ZNZ4_SOYBN	Q9ZNZ4	X	X	X
Trypsin inhibitor					
A OS <i>G. max</i> GN KTI3 PE 1 SV 2	ITRA_SOYBN	P01070	X	X	X
24 kDa protein					
SC24 OS <i>G. max</i>	Q8W0V9_SOYBN	Q8W0V9	X	X	X

GN Gma 2073 PE					
2 SV 1					
Lectin OS <i>G. max</i>	LEC_SOYBN	P05046	X	X	X
GN LE1 PE 1 SV 1					
2S albumin OS	2SS_SOYBN	P19594	X	X	X
<i>G. max</i> PE 1 SV 2					
Uncharacterized					
protein OS <i>G. max</i>	I1KYW9_SOYBN	I1KYW9	X	X	X
GN Gma 13341 PE					
4 SV 1					
Uncharacterized					
protein OS <i>G. max</i>	I1LQR8_SOYBN	I1LQR8	X	X	X
GN Gma 20455 PE					
4 SV 1					
Glycinin G1 OS <i>G.</i>					
<i>max</i> GN GY1 PE 1	GLYG1_SOYBN	P04776	X	X	X
SV 2					
Glycinin G2 OS <i>G.</i>					
<i>max</i> GN Gy2 PE 1	GLYG2_SOYBN	P04405	X	X	
SV 2					
Glycinin G4 OS <i>G.</i>					
<i>max</i> GN GY4 PE 1	GLYG4_SOYBN	P02858	X	X	X
SV 1					
β-conglycinin					
alpha subunit OS	Q948X9_SOYBN	Q948X9	X	X	X
<i>G. max</i> PE 2 SV 1					
Putative					
uncharacterized	C6SY93_SOYBN	C6SY93	X	X	
protein OS <i>G. max</i>					
PE 2 SV 1					
β- conglycinin beta	F7J077_SOYBN	F7J077	X	X	X
subunit OS <i>G. max</i>					

GN CG beta 2 PE					
4 SV 1					
Endo-1,3-β					
glucanase OS G.	Q6S9W0_SOYBN	Q6S9W0	X	X	X
max PE 2 SV 1					
Glycinin A3B4					
subunit OS G. max	Q7GC77_SOYBN	Q7GC77	X	X	X
PE 1 SV 1					
Glycinin OS G.					
max GN A5A4B3	Q9SB11_SOYBN	Q9SB11	X	X	X
PE 2 SV 1					
Glycinin OS G.					
max GN Gy4 PE 4	Q43452_SOYBN	Q43452	X	X	X
SV 1					
Hydrophobic seed					
protein fragment	Q3HM29_SOYBN	Q3HM29	X	X	X
OS G. max PE 4					
SV 1					
Kunitz trypsin					
inhibitor 3 OS	Q9LD16_SOYBN	Q9LD16	X	X	X
G.max PE 4 SV 1					
Kunitz type					
trypsin inhibitor	KT11_SOYBN	P25272	X	X	X
KT11 OS G. max					
GN KT11 PE 2 SV					
1					
Putative					
uncharacterized	C6T9L1_SOYBN	C6T9L1	X	X	X
protein OS G. max					
PE 2 SV 1					
Uncharacterized					
protein OS G. max	I1JW44_SOYBN	I1JW44	X	X	X

GN Gma 308 PE 4**SV 1**

Uncharacterized					
protein OS <i>G. max</i>	I1M099_SOYBN	I1M099	X	X	X
GN Gma 51594 PE					
4 SV 1					

A predição de peptídeo sinal por pelo menos dois dos programas citados foi utilizado como critério de classificação das proteínas em via clássica de secreção.

Tabela 4 – Predição de proteínas secretadas pelas sementes de soja – cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, pela via não clássica, por meio do programa SecretomeP 2.0

Proteína	Entrada	NN-Escore*
Bowman-Birk type proteinase inhibitor D II OS <i>G. max</i> PE 1 SV 2	P01064	0,858
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 40006 PE 4 SV 1	C6T0L2	0,778
Uncharacterized protein OS <i>G. max</i> GN Gma 37167 PE 4 SV 1	I1L957	0,521
Seed maturation protein PM21 OS <i>G. max</i> GN PM21 PE 4 SV 1	Q9S7N8	0,891
Bowman-Birk proteinase inhibitor fragment OS <i>G.max</i> PE 2 SV 1	Q9SBA9	0,648
Bowman-Birk type proteinase inhibitor C II OS <i>G. max</i> PE 1 SV 2	P01063	0,913

*NN-escores maiores que 0,5 são utilizados para predição de proteínas localizadas no meio extracelular.

5.3 Determinação qualitativa de metabólitos secundários

Os exsudatos das cultivares BRS-Pala e BRS-Macota revelaram a presença de diferentes classes de compostos, tais como fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, triterpenóides e saponinas. Tendo em vista a presença de metabólitos secundários, foi procedida a diálise exaustiva dos exsudatos contra água destilada, em membranas com *cut-off* de 3 kDa. Após a diálise, a maioria destes compostos não se mostrou mais presente dos exsudatos, com exceção da classe das flavonas, flavonóis e xantonas, que se mantiveram na cultivar BRS-Macota (Tabela 5). Entretanto, perfis eletroforéticos foram mantidos, em Tricina-PAGE-SDS, quando comparados exsudatos brutos e dialisados, mostrando a mesma predominância de bandas proteicas descritas anteriormente, em particular daquela na faixa de 45 kDa (Figura 9).

5.4 Detecção de proteínas relacionadas à defesa vegetal

Os exsudatos dialisados de sementes de soja apresentaram várias atividades vinculadas às proteínas de defesa (Tabela 6). Uma dessas proteínas diz respeito à lectina, cuja presença foi detectada pela comprovação da capacidade dos exsudatos de aglutinarem eritrócitos de coelho, particularmente após o tratamento destes com a enzima tripsina. O exsudato da cultivar BRS-Pala apresentou atividade específica ($609,52 \pm 0,00$ UH/mgP) bem maior do que aquela verificada para a cultivar BRS-Macota ($9,33 \pm 2,31$ UH/mgP). Quando utilizados eritrócitos de coelho não tripsinizados, apenas o exsudato da cultivar BRS-Pala foi capaz de promover sua aglutinação, tendo sido detectada uma atividade específica de $126,98 \pm 43,99$ UH/mgP.

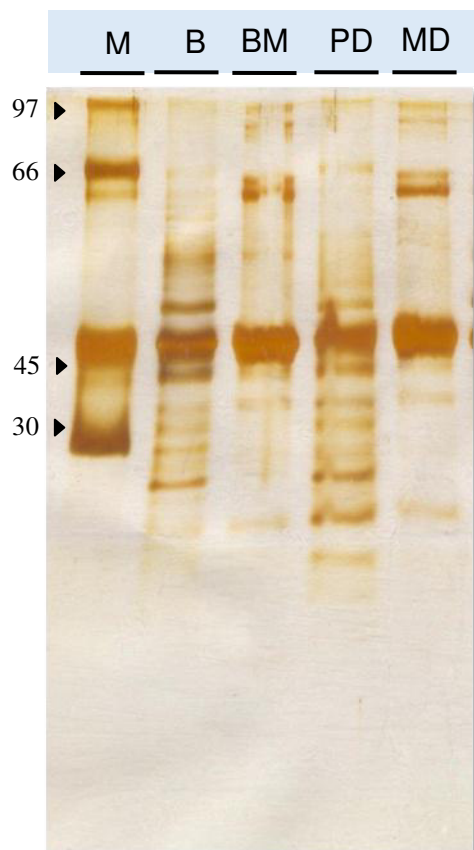
Da mesma forma, ambos os exsudatos de sementes de soja mostraram a presença de inibidores de enzimas proteolíticas. Tais exsudatos foram capazes de inibir a hidrólise do substrato BAPNA, causada pela enzima tripsina. A cultivar BRS-Pala apresentou maior atividade ($4,81 \pm 0,23$ mg de tripsina inibida/mgP), quando comparada àquela mostrada pela cultivar BRS-Macota ($2,08 \pm 0,10$ mg de tripsina inibida/mgP). Os exsudatos de sementes de soja foram ainda capazes de inibir a ação da papaína sobre o substrato BANA, tendo as cultivares BRS-Pala e BRS-Macota apresentado atividades específicas de $30,48 \pm 1,83$ UI/mgP e $22,56 \pm 1,18$ UI/mgP, respectivamente.

Tabela 5 - Análise qualitativa da presença de metabólitos secundários nos exsudatos bruto e dialisado de sementes de soja – cv. BRS-Pala e BRS-Macota

Metabólitos Secundários	Exsudato de BRS-Pala		Exsudato de BRS-Macota	
	Bruto	Dialisado	Bruto	Dialisado
Fenóis	+	-	+	-
Taninos	-	-	-	-
Antocianinas e Antocianidinas	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	+	-	+	+
Flavononóis	-	-	-	-
Flavononas	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-
Chalconas e Auronas	-	-	-	-
Esteróis	-	-	-	-
Triterpenóides	+	-	+	-
Saponinas	+	-	+	-
Alcalóides	-	-	-	-

Sinais (+) ou (-) indicam presença ou ausência, respectivamente, do metabólito.

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Tricina-PAGE-SDS) dos exsudatos de sementes de soja – cv. BRS-Pala e BRS-Macota



(M) Marcador; (BP) Exsudato de sementes cv. BRS-Pala - 25 μ g; (BM) Exsudato de sementes cv. BRS-Macota - 25 μ g; (PD) Exsudatos dialisados de sementes cv. BRS-Pala - 25 μ g; (MD) Exsudatos dialisados de sementes cv. BRS-Macota - 25 μ g. As massas dos marcadores são mostradas em kDa.

Tabela 6 - Avaliação da presença de proteínas relacionadas à defesa vegetal nos exsudatos de sementes de soja – cv. BRS-Pala e BRS-Macota

Atividade	BRS-Pala	BRS-Macota
Hemaglutinante (UH^a/mgP)		
Eritrócitos não tratados	126,98 ± 43,99	Não detectada
Eritrócitos tratados	609,52 ± 0,00a	9,33 ± 2,31b
Inibitória de Tripsina (mg tripsina inibida/mgP)		
	4,81 ± 0,23a	2,08 ± 0,10b
Inibitória de Papaína (UI^b/mgP)		
	30,48 ± 1,83a	22,56 ± 1,18b
Proteolítica (UAPr^c/mgP.min)		
	1,52 ± 0,05a	0,69 ± 0,04b
Peroxidásica (UAP^d/mgP.min)		
	0,096 ± 0,02b	0,218 ± 0,01a
β-1,3-Glucanásica (ηkatGLU^e/mgP)		
	58,26 ± 3,02a	38,11 ± 3,46b
Quitinásica (ηkat^f/mgP)		
	Não detectada	Não detectada

^aUH: Unidade de hemaglutinação, sendo calculada a partir da maior diluição da amostra capaz de aglutinar eritrócitos; ^bUI: Decréscimo de 0,01 da absorbância em relação à atividade da enzima; ^cUAPr: Quantidade de radicais “azo” liberados (420 nm); ^dUAP: Variação de uma unidade de absorbância (470 nm) foi definida como uma unidade de atividade peroxidásica; ^eηKatGLU: 1 ηmol de glucose liberado por segundo; ^fηkat/mgP: ηmol de N-acetil-D-glusamina liberado por segundo. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes em cada atividade ($p < 0,05$, Teste t de Student).

Além das proteínas citadas, os exsudatos de sementes mostraram a presença de várias outras proteínas. As atividades proteolíticas para as cultivares BRS-Pala e BRS-Macota corresponderam a $1,52 \pm 0,05$ e $0,69 \pm 0,04$ UAPr/mgP.min, respectivamente. Os exsudatos se mostraram também capazes de produzir glucose livre a partir do substrato laminarina. A atividade específica observada para a cultivar BRS-Pala foi $58,26 \pm 3,02$ η katGLU/mgP, maior que a detectada para a cultivar BRS-Macota ($38,11 \pm 3,46$ η katGLU/mgP). Adicionalmente, os exsudatos apresentaram atividade peroxidásica, tendo sido, desta vez, detectada uma maior atividade específica na cultivar BRS-Macota ($0,218 \pm 0,01$ UAP/mgP.min), quando comparada com a cultivar BRS-Pala ($0,096 \pm 0,02$ UAP/mgP.min).

Por outro lado, os exsudatos de sementes de ambas as cultivares analisadas não foram capazes de promover a hidrólise do biopolímero quitina, nas condições experimentais empregadas, indicando a ausência de atividade quitinásica.

5.5 Efeitos dos exsudatos de sementes sobre *M. incognita* (raça 1)

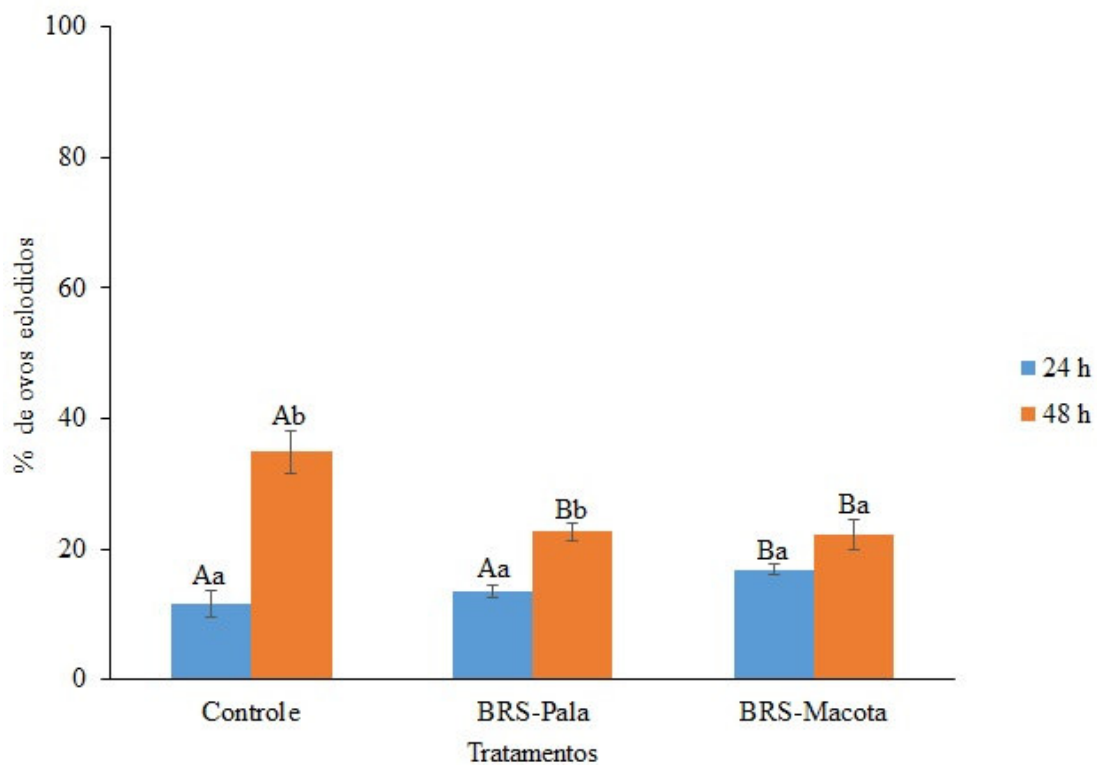
5.5.1 Efeito sobre a eclosão de ovos de *M. incognita*

Exsudatos de sementes de soja foram capazes de interferir na taxa de eclosão de ovos do nematoide das galhas *M. incognita* (Figura 10). Uma redução de 37% no percentual de ovos eclodidos foi verificada para ambos os exsudatos das cultivares analisadas, no tempo de 48 horas, não havendo diferença entre as amostras-teste. Contudo, com 24 horas de exposição às amostras, o grupo referente à BRS-Macota apresentou taxa de eclosão ligeiramente superior ($16,89 \pm 0,89$), porém significativa, àquelas apresentadas por BRS-Pala ($13,56 \pm 0,97$) e pelo grupo controle ($11,56 \pm 1,98$).

5.5.2 Efeito sobre a mobilidade/mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2)

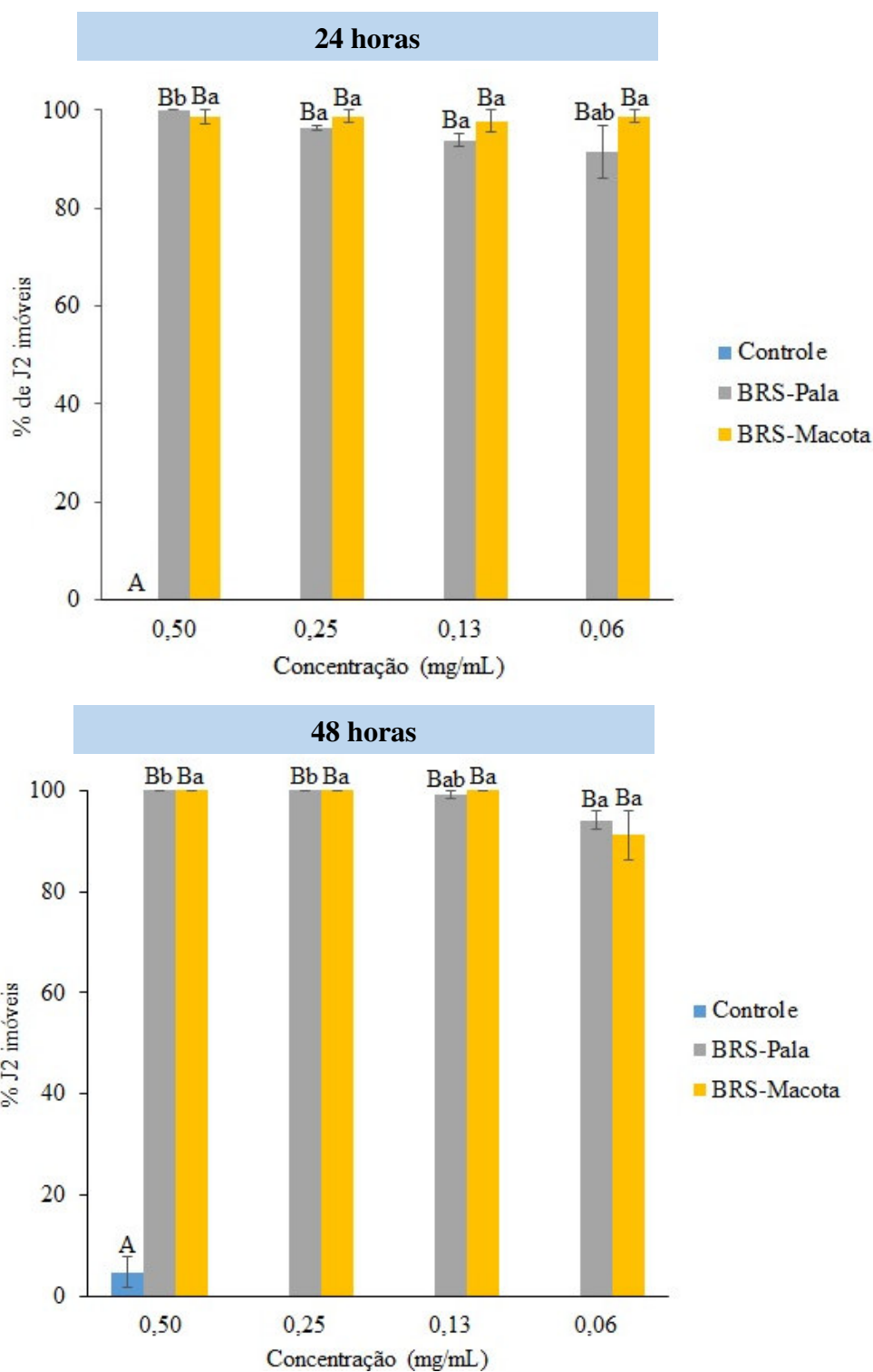
Os tratamentos designados para avaliação dos efeitos dos exsudatos de sementes de soja sobre a mobilidade de *M. incognita* indicaram diferenças em relação aos respectivos controles em todas as situações testadas, alcançando percentuais de inibição sempre acima de 90% (Figura 11).

Figura 10 – Efeitos dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a eclosão de *M. incognita*



As barras representam o percentual de ovos eclodidos após o intervalo de 24 e 48 h em contato com os exsudatos de sementes. Controle: água. Letras maiúsculas distintas indicam médias diferentes entre colunas da mesma cor, enquanto que letras minúsculas distintas indicam médias diferentes entre barras de cores desiguais ($p < 0,05$; Teste da Mediana).

Figura 11 – Efeitos dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a mobilidade de juvenis (J2) de *M. incognita*



As barras mostram o percentual de J2 imóveis após os intervalos de 24 e 48 horas em contato com as amostras. Controle: água. Letras maiúsculas distintas indicam médias diferentes entre colunas de cores desiguais, enquanto que letras minúsculas distintas indicam médias diferentes entre barras da mesma cor ($p < 0,05$; Teste da Mediana).

Por sua vez, diferenças entre os exsudatos das duas cultivares utilizadas não foram verificadas, nas condições de ensaio empregadas. Quando avaliado esse mesmo parâmetro frente às concentrações de proteínas utilizadas no ensaio, diferenças não foram observadas com a cultivar BRS-Macota. Entretanto, BRS-Pala na concentração mais baixa (0,06 mg/mL) apresentou percentual de inibição de mobilidade ligeiramente menor, particularmente quando consideradas as 48 horas após (Figura 10).

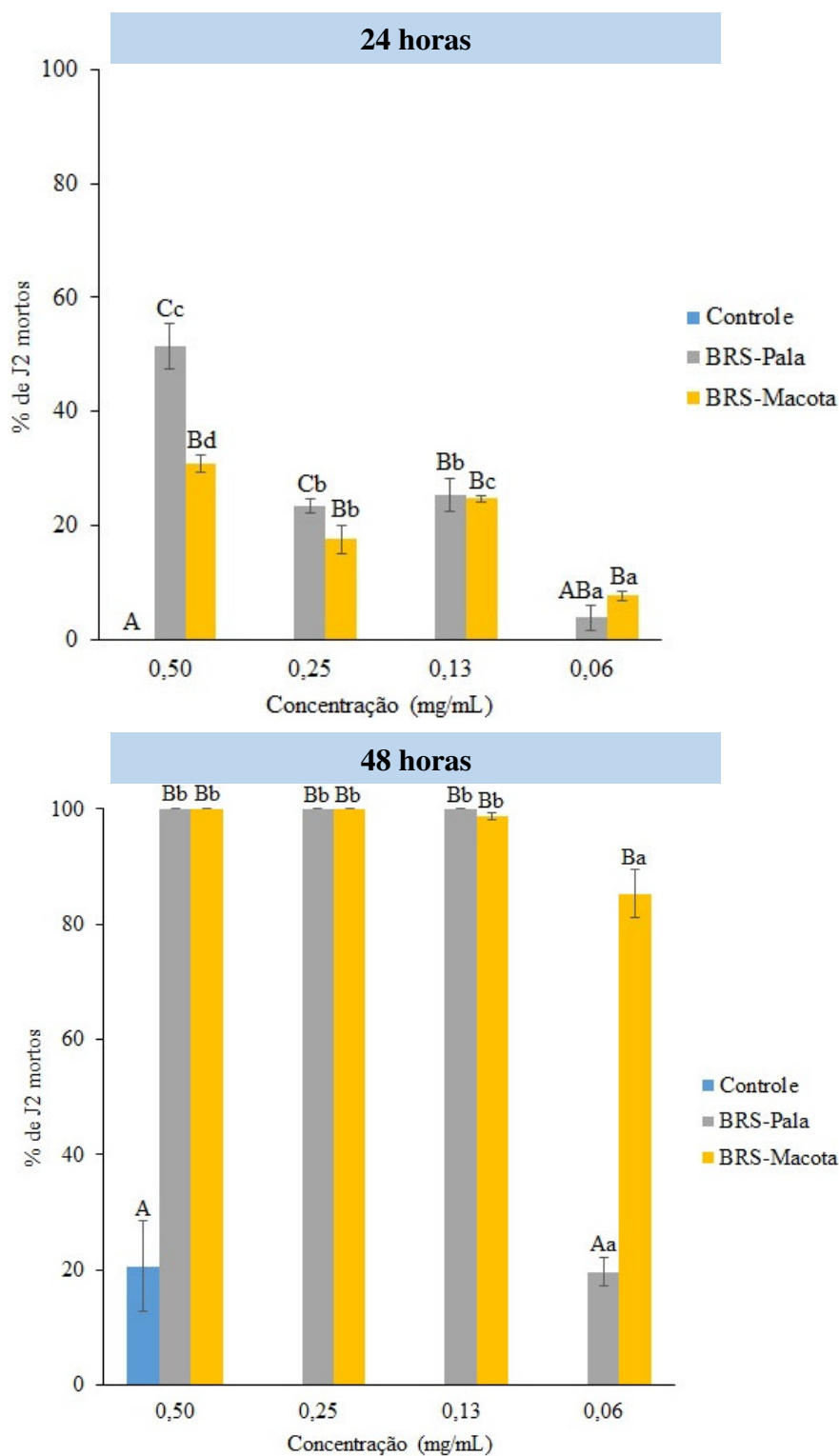
Quanto à taxa de mortalidade dos nematoides frente à exposição aos exsudatos de soja, uma relação direta com a concentração de proteína utilizada foi observada (Figura 11). Esse fato foi bem evidente no tempo de 24 horas, com a concentração de 0,5 mg/mL, que causou maior percentual de morte. As taxas de mortalidade foram, ainda, diferentes quando comparados os exsudatos das cultivares BRS-Pala e BRS-Macota que, nas concentrações de 0,5 e 0,25 mg/mL, atingiram valores de 51% e 23%, em contraste aos valores de 31% e 18%, respectivamente.

Com o tempo de exposição mais prolongado, isto é, de 48 horas, o exsudato de BRS-Macota foi capaz de induzir taxa de mortalidade dos J2 diferente daquela do grupo, em todas as concentrações testadas. Já o exsudato de BRS-Pala apenas se mostrou ativo, causando 100% de mortalidade, nas concentrações mais elevadas (0,5; 0,25 e 0,13 mg/mL) (Figura 12).

5.5.3 Efeito sobre a atratividade de *M. incognita*

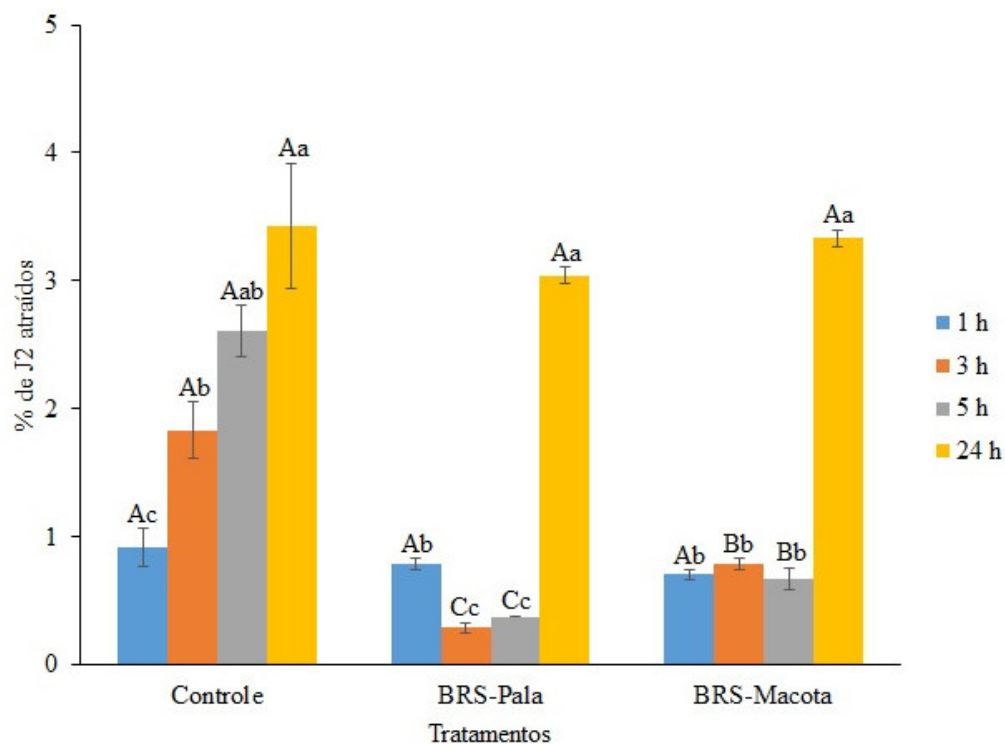
A capacidade dos exsudatos de sementes de soja de repelir ou atrair as formas infectivas de *M. incognita* foi testada, tendo sido verificado no grupo controle um aumento no número de nematoides presentes no halo de atração, ao longo do tempo de observação. Em relação aos tratamentos, os exsudatos das cultivares BRS-Pala e BRS-Macota apresentaram capacidade de repelência, nos tempos de 3 e 5 horas, tendo sido detectado que, no caso de BRS-Pala, a repelência foi maior, com percentagem de nematoides presentes no halo de atração de apenas 0,29%, no tempo de 3 horas. Contudo, após 24 horas de ensaio, a repelência apresentada por ambas as cultivares desapareceu, não havendo diferenças entre os tratamentos e nem mesmo em relação ao controle (Figura 13).

Figura 12 – Efeitos dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a mortalidade de juvenis (J2) de *M. incognita*



As barras mostram o percentual de J2 mortos após o intervalo de 24 e 48 horas em contato com as amostras. Controle: água. Letras maiúsculas distintas indicam médias diferentes entre colunas de cores desiguais, enquanto que letras minúsculas distintas indicam médias diferentes entre barras de mesma cor ($p < 0,05$; Teste da Mediana).

Figura 13 – Efeito quimiostático dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre formas juvenis (J2) de *M. incognita*

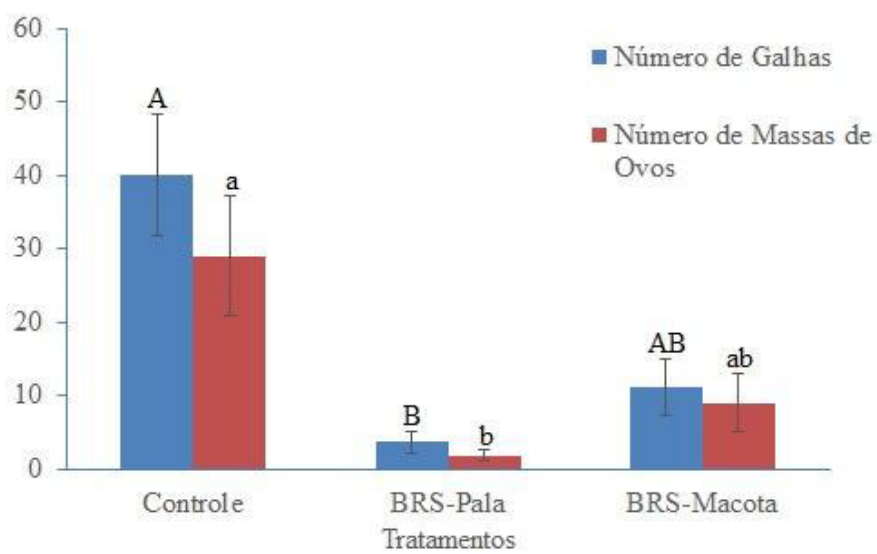


As barras mostram o percentual de J2 atraídos após o intervalo de 1, 3, 5 e 24 horas em contato com a amostra. Controle: água. Letras maiúsculas distintas indicam médias diferentes entre colunas da mesma cor, enquanto que letras minúsculas distintas indicam médias diferentes entre barras de cores desiguais ($p < 0,05$; Teste da Mediana).

5.5.4 Efeito sobre a infectividade de *M. incognita*

Quando avaliados os efeitos deletérios dos exsudatos de sementes de soja sobre a infectividade de J2 de *M. incognita*, no sistema *in vivo*, alteração foi observada, tomando como base a redução dos números de galhas e massas de ovos em raízes de tabaco. Após o período de 45 dias da inoculação das raízes com nematoides, o grupo inoculado com nematoides tratados com o exsudato da cultivar BRS-Pala apresentou médias de 3,6 e 1,8 para o número de galhas e massas de ovos, respectivamente. Esses valores foram inferiores, a mais de 10 vezes, àqueles verificadas para o grupo controle, cujos números corresponderam a 40 e 29. Para o grupo inoculado com J2 tratados com o exsudato da cultivar BRS-Macota, uma redução, de cerca de 3 vezes, da taxa de infectividade em relação ao grupo controle ocorreu, porém essa diferença não foi considerada significativa. Por outro lado, tal resultado não foi também considerado significativamente diferente daquele verificado com o tratamento envolvendo a cultivar BRS-Pala (Figura 14).

Figura 14 - Efeito dos exsudatos de sementes de soja, cv. BRS-Pala e BRS-Macota, sobre a infectividade de formas juvenis (J2) de *M. incognita*



As barras mostram valores referentes ao número de galhas e massas de ovos após o intervalo 45 dias da inoculação. Controle: água. Letras distintas indicam médias diferentes entre barras de mesma cor ($p < 0,05$; Teste da Mediana).

6. DISCUSSÃO

Durante seu ciclo de vida, as plantas são capazes de liberar, por meio de vários órgãos, compostos capazes de interferir no ambiente disposto ao seu redor. Estes compostos podem vir a funcionar como atrativo a microrganismos e, ao mesmo tempo, inibir a simbiose, predação ou o parasitismo desenvolvido por estes (NELSON, 1990). Dentre as partes vegetais capazes de exsudar moléculas relacionadas à interação planta-microrganismo, destaca-se a semente, cuja atividade metabólica, após a embebição, também resulta na exsudação de substâncias com efeitos benéficos ao processo germinativo e ao estabelecimento da plântula (BARBOUR; HATTERMANN; STACEY, 1991).

O número de trabalhos descritivos sobre a composição de exsudatos de sementes aumentou nas últimas décadas, tendo-se como grupos mais bem relatados aqueles envolvendo moléculas com baixa massa molecular, tais como flavonoides, esteróis, ácidos graxos e peptídeos (TERRAS *et al.*, 1995; CASEY *et al.*, 1998). Contudo, ainda são poucos os trabalhos que procuram identificar e caracterizar proteínas presentes em exsudatos, além de relacioná-las às ações de defesa frente aos fitopatógenos de solo (TERRAS *et al.*, 1995; ROSE *et al.*, 2006).

Em exsudatos de sementes de soja já foram identificadas várias proteínas relacionadas à defesa, tais como peroxidases, α -galactosidases e β -1,3-glucanases (SANTOS *et al.*; 2008; PALAVALLI *et al.*, 2012). Entretanto, o desenvolvimento de genótipos resistentes leva a perda e a subestimação de muitos genes e proteínas de defesa, tornando-se necessária a identificação dessas moléculas dentro de um contexto comparativo e funcional. Para tanto, o presente trabalho buscou identificar as proteínas exsudadas por duas cultivares de soja com índices de resistência distintos ao nematoide das galhas *M. incognita*, além da detecção de atividades *in vitro* referentes às proteínas bioativas.

As condições de embebição das sementes foram propostas por Rocha (2011), com uso do tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. A exsudação foi baseada nas recomendações existentes para o plantio de soja em solos ácidos, com pH entre 5,0 e 6,0. De um modo geral, esses valores de pH são considerados ótimos para o desenvolvimento das plantas (KÄMPF, 2000), enquanto que valores superiores a 6,5 podem desestabilizar as membranas celulares dos ápices radiculares, afetando a estabilidade e absorção radiculares (BALLARIN, 2004). Adicionalmente, o tempo de embebição foi estabelecido em 18 horas, o qual resultou um alto

teor proteico (OLIVEIRA, 2009), sendo, portanto, considerado o tempo mais promissor para condução deste trabalho.

Tendo sido as condições de exsudação definidas, análises iniciais através de eletroforeses uni- e bidimensional permitiram evidenciar diferenças proteicas entre os exsudatos de sementes das cultivares selecionadas. Para a cultivar BRS-Macota, 89 spots bem separados foram visualizados, exibindo um perfil bastante semelhante ao de 93 spots detectados e parcialmente identificados por Palavalli e colaboradores (2012) na cultivar Williams 82. Em contrapartida, exsudatos de sementes da cultivar BRS-Pala apresentaram uma maior diversidade de proteínas, dispostas na forma de 146 spots. Esse mesmo padrão de heterogeneidade também pode ser observado, embora de maneira mais discreta, na distribuição das 64 proteínas identificadas por espectrometria de massas de amostra complexa. Uma comparação deste resultado com dados proteômicos de exsudatos de sementes da leguminosa *Lupinus albus* (SCARAFONI *et al.*, 2013) e da própria soja cv. Williams 82 (PALAVALLI *et al.*, 2012) mostra discrepância no número de moléculas de natureza proteica identificadas com o uso da eletroforese bidimensional associada a LC-ESI-MS/MS. No primeiro trabalho citado, cerca de 47 proteínas, dos 60 spots detectados, foram descritas, quantidade bem menor em relação ao obtido para os proteomas de exsudatos de BRS-Pala e BRS-Macota, embora as duas espécies apresentem concentrações de proteínas semelhantes em suas sementes maduras (GUÉGUEN; CERLETTI, 1994). Por sua vez, a caracterização do proteoma de sementes de soja embebidas em água morna levou à identificação de 90 proteínas. Segundo MURAD e RECH (2012), essa quantidade pode corresponder a um número real ainda menor, visto que muitas dessas identificações são associações de uma mesma proteína com variações de pI. Na definição de proteoma livre de gel de eletroforese, os resultados revelam apenas moléculas individuais. Algumas exceções podem ser observadas especialmente para as proteínas que possuem subunidades com sequências de aminoácidos semelhantes, tais como glicinina e β -conglucina, mas estas são identificadas com um número de acesso diferente no banco de dados UniProt.

A identificação de proteínas neste trabalho foi realizada por meio de estudo proteômico livre de gel, tendo em vista as limitações que o uso da eletroforese bidimensional pode acarretar aos resultados. Algumas das razões por trás dessa escolha estão relacionadas às dificuldades apresentadas para definição de protocolo ótimo de preparo de amostra e focalização isoeletrica, reprodutibilidade dos géis, bem como a má representação de proteínas com características extremas. Adicionalmente, a co-migração de proteínas numa única

mancha torna a quantificação bastante imprecisa. No entanto, elevada complementaridade entre eletroforese bidimensional e abordagens livre de gel tem sido ressaltada (FINAMORE *et al.*, 2010; CHARRO *et al.*, 2011), permitindo que ambos os métodos possam ser considerados em estudos futuros.

Dentre as proteínas identificadas neste trabalho, aquelas pertencentes ao grupo das proteínas de reserva podem ser destacadas. Esse tipo de molécula pode ser mobilizada, vindo a atuar em importantes processos fisiológicos de sementes, como manutenção energética e crescimento da plântula, visto os aminoácidos, gerados pela sua degradação, serem reutilizados em um processo de biossíntese *de novo* de novas proteínas (MUNTZ, 1998). Não menos importante, algumas dessas moléculas podem exercer um papel ativo na defesa vegetal contra patógenos por meio de atividades antimicrobianas já bem descritas na literatura (AGIZZIO *et al.*, 2003).

Em sementes de soja, cerca de 80 proteínas de reserva já foram identificadas (MOONEY; KRISHNAN; THELEN, 2004; NATARAJAN *et al.*, 2006), estando elas classificadas em uma das quatro categorias básicas: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em solução salina), prolaminas (solúveis em álcool) e glutelinas (solúveis em ácidos/bases diluídos) (KRISHNAN; NELSON, 2011). Segundo Asano e colaboradores (1989) e Hirano e colaboradores (1992), a proteína tida como mais abundante em exsudatos de sementes de soja é a globulina 7S básica, sintetizada como um precursor de 43 kDa e com funções moleculares, determinadas pelo *Gene Ontology*, de uma endopeptidase do tipo aspártica e de depósito de nutrientes. Embora essa proteína ligante à leginsulina esteja presente nos exsudatos de sementes de soja nas cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, ela não se mostra como a mais expressa, perdendo em quantificação relativa para HPSE_SOYBN – Proteína hidrofóbica de sementes e I1LE41_SOYBN – Proteína não caracterizada, respectivamente.

Outras classes de proteínas de reserva abundantemente expressas em exsudatos de sementes de soja são as das glicininas e β -conglucinas, também classificadas como globulinas 11S e 7S, respectivamente. Essas moléculas se evidenciam ainda mais no perfil proteômico de BRS-Pala, uma vez que, das cinco moléculas mais expressas por esta cultivar, três são glicininas. Glicininas são proteínas hexaméricas transcritas e traduzidas a partir de cinco genes não alelos, Gy1, Gy2, Gy3, Gy4 e Gy5. Estes genes codificam cinco moléculas precursoras da glicinina, G1, G2, G3, G4 e G5 (NIELSEN *et al.*, 1989; RENKEMA; KNABBEN; VLIET, 2001), que são clivadas em duas ou três cadeias por modificação pós

traducional (DICKINSON; HUSSEIN; NIELSEN, 1989). Com base na similaridade apresentada por suas sequências de aminoácidos, estas moléculas precursoras são, ainda, classificadas em dois grupos: grupo I consistindo em G1 (A1aBx) G2 (A2B1a) e G3 (A1aB1b) e grupo II em G4 (A5A4B3) e G5 (A3B4) (CHO; DAVIES; NIELSEN, 1989; UTSUMI; MATSUMURA; MORI, 1997). Em exsudatos de sementes de soja das cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, precursores de glicininas G1, G2, G4 e G5 foram detectados, contrastando com os dois únicos tipos G1 e G2 encontrados em exsudatos da cultivar Williams 82 (PALAVALLI *et al.*, 2012).

β -conglucina também foi detectada em exsudatos de soja. Essa classe proteica, que representa de 17,8 a 23,0% do conteúdo total da semente madura (GOMES *et al.*, 2013), apresenta-se como uma estrutura trimérica formada pelas subunidades α , α' e β , ligadas por ligações não covalentes (NIELSEN *et al.*, 1989; CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 2008). Em exsudatos de soja, apenas as subunidades α e β foram detectadas, se destacando esta última, única na cultivar BRS-Pala.

Dentro da classificação tradicional de proteínas de reserva de vegetais, encontra-se ainda a albumina 2S, proteína solúvel em água e com baixa massa molecular que, também, se mostrou presente nos dois exsudatos de soja aqui analisados. Contudo, segundo Cândido e colaboradores (2011), outras classes de moléculas comumente envolvidas em outros processos vegetais podem ainda se encaixar como proteínas de reserva, compreendendo as lectinas e os inibidores de protease do tipo Kunitz.

Lectinas são proteínas capazes de se ligar a carboidratos específicos de forma não catalítica (MOREIRA *et al.*, 1998; TEIXEIRA-SÁ *et al.*, 2009). Com massas moleculares diversas, essas moléculas apresentam vários padrões de nomenclatura que podem se basear em suas estruturas secundárias e terciárias ou mesmo em interações moleculares entre seus resíduos de aminoácidos. Dentre essas classificações, lectinas podem apresentar uma nomenclatura adicional relativa à presença da propriedade de ligação a eritrócitos tão comum em seus estudos iniciais. Surge, então, o termo aglutinina, designado às lectinas capazes de aglutinar células (CÂNDIDO *et al.*, 2011). Adicionalmente, essas moléculas são amplamente estudadas dentro do reino vegetal, mas seu papel biológico ainda permanece pouco definido dentro dos táxons. Tais proteínas podem estar envolvidas no transporte de açúcares, reserva de carboidratos ou funcionar, ainda, como chaperonas (VAN DAMME *et al.*, 2004; LIU; LI, 2013). Suas propriedades de adesão e aglutinação de células podem também estar relacionadas à interações simbióticas e patogênicas entre microrganismos e planta hospedeira

(AUDFRAY *et al.*, 2012). Dentro do grupo das leguminosas, as lectinas podem ser expressas tanto em tecidos vegetativos, tanto em sementes. Quando em sementes, essas proteínas se localizam em cotilédones, podendo ser lançadas ao meio externo durante os estágios iniciais da germinação (FOUNTAIN *et al.*, 1977). Em exsudatos de soja, cultivares BRS-Pala e BRS-Macota, a proteína precursora da aglutinina da soja (SBA) foi detectada em níveis semelhantes. Essa proteína composta por 285 aminoácidos sofre clivagem N-terminal, que gera a proteína tetramérica madura, com 30 kDa/subunidade (SHARON; LIS, 2003).

Outro grupo de proteínas de reserva diz respeito aos inibidores de proteases do tipo Kunitz, que são proteínas capazes de inibir a ação de enzimas proteolíticas serínicas, como a tripsina. Em soja, diversos inibidores de tripsina já foram reportados, perfazendo cerca de 6% das proteínas totais de sementes. Mesmo assim, grande parte da atividade inibitória de tripsina apresentada nestas é ainda desempenhada pelo inibidor de tripsina do tipo Kunitz – KTI (RICKS *et al.*, 1962). Esse tipo de inibidor é codificado por pelo menos 10 genes, tendo quatro (*Kti1*, *Kti2*, *Kti3* e *Kti4*) já apresentado evidências de transcrição de seus mRNA's correspondentes (JOFUKU; GOLDBERG, 1989). Dos inibidores do tipo Kunitz expressos em soja, apenas os codificados pelo gene *Kti3* se mostram como moléculas biologicamente ativas, produzindo três isoformas codominantes (T^a, T^b e T^c) de proteínas monoméricas e não glicosiladas, formadas por 181 resíduos de aminoácidos e, portanto, com massas moleculares de cerca de 20 kDa (HYMOWITZ; HARDLY, 1972; ORF; HYMOWITZ, 1976).

Nos exsudatos analisados neste trabalho, foram encontrados inibidores de tripsina codificados tanto pelo gene *Kti1*, quanto pelo gene *Kti3*. Desta forma, as isoformas presentes nos exsudatos e produzidas a partir de *Kti3*, codificadas apenas pelos alelos T^a e T^b, são os inibidores do tipo Kunitz que apresentam atividade inibitória de tripsina, não ficando claro o papel do outro inibidor no processo germinativo.

Conclui-se, então, a caracterização das proteínas de reserva encontradas em sementes de soja. Durante o processo de enchimento dos grãos, moléculas desse grupo são protegidas de degradação prematura por meio de diversos mecanismos. O principal deles consiste na exportação dessas moléculas do citoplasma para vacúolos de reserva. Essa exportação é mediada por sequências lineares de aminoácidos localizadas na porção N-terminal de polipeptídeos chamadas de peptídeos sinais. O peptídeo sinal de uma dada proteína em síntese interage com a porção citoplasmática do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) por meio de uma proteína de reconhecimento de sinal (SRP) presente neste. Tal

proteína de reconhecimento dirige a elongação do polipeptídeo para o lúmen do RER. Lá, ocorre a proteólise do peptídeo sinal, o dobramento da proteína e a formação das ligações dissulfeto. Posteriormente, a proteína é transportada para o Complexo de Golgi onde é direcionada a um vacúolo de reserva devido a um segundo sinal presente em sua sequência (CHENG, 2009).

Proteínas presentes em exsudatos de sementes de soja devem ser consideradas proteínas secretadas, contudo, apenas 29, de 60 sequências FASTA obtidas no banco de dados UniProtKB, apresentaram predição de peptídeo sinal pelos programas testados. Surge, então, o questionamento sobre o modo de secreção das proteínas restantes.

Atualmente, existem muitos relatos sobre a existência de proteínas vegetais secretadas por rotas independentes do RER-Complexo de Golgi (ROSE; LEE, 2010). Os critérios de identificação de proteínas secretadas por essas vias não tradicionais se baseiam, principalmente, na ausência de um peptídeo sinal tradicional, com três domínios: região N-terminal carregada positivamente, região central hidrofóbica e região C-terminal polarizada (GIERASCH, 1989). A ausência de modificações pós-traducionais e a resistência da exportação da proteína a tratamento com Brefeldina A (BFA) são também evidências de uma secreção por via não clássica (ROSE; LEE, 2010).

Muitos algoritmos têm sido desenvolvidos para auxiliar na predição de proteínas secretadas independentemente do RER-Complexo de Golgi. Estes utilizam métodos que envolvem a identificação de características estruturais conservadas ou frequentemente observadas em proteínas secretadas por mamíferos, ou no caso de SecretomeP, por bactérias. Embora SecretomeP venha sendo amplamente utilizado na caracterização do secretoma de *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula* (AGRAWAL *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011), em exsudatos de soja apenas 6 sequências obtiveram NN-escore, ou um escore SecP, maior que 0,5, o que indica uma possível secreção por via não clássica. Essa limitação apresentada pela ferramenta pode ser devido a diferenças de composição e estrutura apresentadas por cada população de proteínas em resposta ao meio extracelular igualmente distinto em cada grupo (ROSE; LEE, 2010).

Dentre as proteínas preditas como parte do secretoma por via não clássica, destacam-se os inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk, uma vez que sua existência em soja já foi demonstrada por meio de transcrito e proteína madura. Essa classe de proteína apresenta uma única cadeia polipeptídica com 71 resíduos de aminoácidos, sendo cerca de 20% destes sulfurados. Similarmente ao KTI, apresenta-se como isoformas A, B, CII, DII e

EII, cada uma com variação em sua composição, mas sempre com 14 resíduos de cisteína (BAEK *et al.*, 1994). Os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) presentes nos exsudatos de soja avaliados neste trabalho consistem apenas nas isoformas CII e DII, estando a última mais expressa na cultivar BRS-Macota.

Visto a variedade de proteínas com possível secreção via não tradicional em exsudatos de soja, é interessante entender quais motivos são os mais prováveis para justificar sua excreção por essa rota. Em algumas situações, modificações pós-traducionais e dobramentos proteicos não são desejáveis para a proteína em questão. Essas proteínas podem, também, perturbar o funcionamento da secreção via RER-Complexo de Golgi, sendo mais vantajosa sua presença em um compartimento distinto (CHENG; WILLIAMSON, 2010). Entretanto, de todas as possíveis razões para a existência desse tipo de secreção, a resposta a um estresse externo se mostra como a mais promissora para este trabalho, uma vez que sugere a existência de um mecanismo de secreção de proteínas citoplasmáticas, envolvidas em uma resposta de defesa (KELLER *et al.*, 2008; CHENG; WILLIAMSON, 2010). Este parece ser o caso da proteínas P21, pertencente ao grupo das proteínas PR-5, família do tipo taumatina. Moléculas desse grupo têm se mostrado, em ensaios *in vitro*, capazes de inibir o crescimento e reprodução de fungos miceliais ao mediar a permeabilização da membrana e lise de hifas e esporos (ROBERTS; SELITRENNIKOFF, 1990; HEJGAARD; JACOBSEN; SVENDSEN, 1991; VIGERS; ROBERTS; SELITRENNIKOFF, 1991; WOLOSHUK *et al.*, 1991; VIGERS *et al.*, 1992). Estando já presente no citosol, a proteína P21 pode então ser prontamente secretada pela via não clássica, garantindo uma velocidade de atuação vantajosa à uma planta atacada.

Conclui-se, até então, que em exsudatos de sementes de soja cultivares BRS-Pala e BRS-Macota se encontram várias proteínas envolvidas na defesa vegetal. Essa determinação do processo biológico em que várias das proteínas estão envolvidas se dá tanto por revisões de literatura, tanto pela anotação de proteínas de acordo com termos do *Gene Ontology*. Ainda assim, faz-se necessário relacionar as proteínas identificadas por meio de espectrometria de massas com atividades *in vitro*, de modo a identificar quais destas podem, de fato, exercer efeitos inibitórios a fitopatógenos.

Como forma de avançar na caracterização dos exsudatos de sementes de soja provenientes de cultivares com diferentes índices de resistência a *M. incognita*, foram realizados, inicialmente, ensaios qualitativos de detecção de metabólitos secundários. Por muito tempo, acreditou-se que essas moléculas pequenas, não comumente relacionadas às

funções vitais ou ao metabolismo básico, não possuíam funções biológicas específicas, sendo apenas consideradas produtos finais de reações. Essa visão, entretanto, foi modificada e tais moléculas passaram a ser relacionadas a componentes estruturais e a defesa contra fitopatógenos (ENGEL *et al.*, 2002; HALL, 2006).

Dentre os metabólitos secundários, os que mais se destacam nos mecanismos de proteção ao parasitismo são os flavonóides, fenóis, terpenos, taninos e saponinas (BOWLES, 1990; XAVIER-FILHO, 1993; MOLAN *et al.*, 2000), tendo sido os flavonoides e esteróis já relatados em exsudatos de sementes. Para as cultivares utilizadas neste trabalho, foram detectadas nos exsudatos moléculas pertencentes aos grupos dos fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, triterpenóides e saponinas. Posteriormente a essa avaliação, os exsudatos foram dialisados de modo a se descartar componentes orgânicos menores que 3,5 kDa, dentre eles açúcares solúveis e moléculas do metabolismo secundário passíveis de influenciar nos ensaios seguintes. Novamente, a detecção qualitativa das classes de metabólitos já citados foi realizada nos exsudatos dialisados de cada cultivar, para verificação do grau de êxito do procedimento. Enquanto em exsudatos de BRS-Pala nenhuma das classes previamente encontradas se manteve em quantidades detectáveis nas condições testadas, em BRS-Macota, flavonas, flavonóis e xantonas permaneceram na fração proteica mesmo após a diálise, o que sugere a formação de conjugados entre tais moléculas, característica já descrita em sementes recém embebidas de soja (GRAHAM, 1991).

Após obtenção das frações proteicas provenientes dos exsudatos de sementes de soja, foi procedida a avaliação de atividades enzimáticas e hemaglutinante, com foco na detecção de propriedades associadas à defesa vegetal. Como já colocado anteriormente, a realização de tais ensaios de detecção se faz necessária, uma vez que a presença de uma dada proteína bioativa na amostra não denota, necessariamente, a existência de sua atividade. Neste trabalho, isso pode ser exemplificado pela ausência de atividade quitinásica em ambos os exsudatos, apesar da detecção de uma quitinase classe I por LC-ESI-MS/MS. A situação inversa, em que a atividade *in vitro* é detectada, mas a proteína correspondente não aparece nos registros da espectrometria de massas, também é passível de acontecer. Este é o caso da atividade inibitória de papaína apresentada pelos exsudatos de soja que não parece estar relacionada com qualquer das moléculas identificadas pela espectrometria de massas, visto nenhuma se caracterizar como uma fitocistatina. A detecção de tal atividade pode, então, ser baseada nos vários relatos da literatura, que indicam a presença de uma atividade inibitória de

catepsina D ou papaína secundária em inibidores de tripsina do tipo Kunitz de outras espécies vegetais (RITONJA *et al.*, 1990).

Exsudatos de soja também foram capazes de inibir, *in vitro*, a ação de proteases de natureza serínica. A partir dos dados apresentados, pode ser concluída a relação entre a atividade inibitória de tripsina e os inibidores ativos do tipo Kunitz e Bowman-Birk presentes nos exsudatos. Como já discutido anteriormente, o KTI é responsável pela maior parte da atividade inibitória de tripsina apresentada na semente. Este fato, aliado à presença do KTI em maior quantidade no exsudato de BRS-Pala, corrobora com a quantidade de tripsina inibida por cada cultivar, com BRS-Pala apresentando maior atividade inibitória em relação à BRS-Macota,

Dentre as propriedades bioativas verificadas nos exsudatos de sementes de soja, a atividade hemaglutinante se destaca como a mais discrepante considerando as cultivares testadas, com o exsudato de BRS-Pala apresentando atividade específica de $609,52 \pm 0,00$ UH/mgP e o de BRS-Macota de $9,33 \pm 2,31$ UH/mgP. Embora os exsudatos de ambas as cultivares apresentem a SBA, e sua concentração seja ligeiramente maior em BRS-Pala, a diferença de atividade entre os exsudatos pode ser favorecida pela maior quantidade e variedade de β -conglucininas e glicininas nessa cultivar. No trabalho realizado por Ma e colaboradores (2011), essas duas classes de proteínas de reserva apresentaram atividade hemaglutinante *in vitro*, com valores relativos a 61,7% e 40,1% da atividade apresentada por SBA.

Em contraste aos dados de atividade hemaglutinante, o exsudato de sementes da cultivar BRS Macota apresentou uma atividade peroxidásica de $0,218 \pm 0,01$ UAP/mgP.min, maior que a verificada no exsudato de BRS-Pala ($0,096 \pm 0,02$ UAP/mgP.min). Contudo, diferentemente da cultivar Williams 82, capaz de exsudar uma peroxidase da casca da semente, exsudatos de BRS-Pala e BRS-Macota parecem ter sua atividade peroxidásica associada às lipoxigenases, detectadas em ambas as cultivares (COOK, 1988).

Em vegetais, lipoxigenases são enzimas comumente associadas a mobilização de lipídeos, por catalisarem a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, tais como ácido linoleico e linolênico, a hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados (SONG *et al.*, 1990; BRASH, 1999; LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2006). Adicionalmente a essa função, lipoxigenases estão envolvidas nos mecanismos de defesa vegetal através da síntese de compostos de sinalização e de atividade antimicrobiana própria (CROFT *et al.*, 1993; CREELMAN; MULLET, 1997; PARCHMANN *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1999). Porém,

durante a germinação de sementes de soja, muitos estudos sugerem a mobilização dessas proteínas como compostos de reserva (SIEDOW, 1991; WANG *et al.*, 1999).

Outras classes de proteínas relacionadas à defesa de plantas foram detectadas por espectrometria de massas e ensaios enzimáticos *in vitro*. Dentre elas, destacam-se uma proteína relacionada à patogênese (PR) e uma proteína não caracterizada, mas com 90% de similaridade com uma protease do tipo aspártica. Endo- β -1,3-glucanases estão envolvidas em importantes processos fisiológicos das sementes, como expansão e divisão celular durante a germinação (WORRALL *et al.*, 1992; SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993). Adicionalmente, sugere-se que essa proteína é um componente do mecanismo de defesa de plantas contra fungos, visto sua capacidade de lisar a célula fúngica por meio da clivagem das ligações β -1,3-glicosídicas em β -1,3-glucanos, principal componente estrutural da parede celular de organismos patogênicos desse grupo (WESSELS; SIETSMA, 1981; BRUNNER *et al.*, 1998; ADAMS, 2004). Proteases, por sua vez, também podem assumir vários papéis na proteção da semente contra fungos, seja degradando proteínas do próprio organismo invasor, seja ativando outras proteínas da planta através da quebra de seus precursores (VAN DER HOORN; JONES, 2004).

A detecção por LC-ESI-MS/MS de proteínas relacionadas a ações antifúngicas, tais como proteína P21, endo- β -1,3-glucanases, proteases, associada à presença de suas atividades enzimáticas correspondentes, sugere a presença de atividade antifúngica nos exsudatos de soja. Entretanto, os exsudatos de sementes de ambas as cultivares não foram capazes de inibir a germinação e o crescimento dos fungos *Fusarium solani* e *F. oxysporum* em ensaios *in vitro* (dados não apresentados).

Apesar da ausência de atividade antifúngica, exsudatos de sementes de soja das cultivares BRS-Pala e BRS-Macota se mostraram capazes de exercer efeitos inibitórios sobre o nematoide das galhas *M. incognita*, independente do índice de desempenho em resposta ao fitopatógeno, associado a cada uma. A não correlação entre resistência e ação anti-nematoide dos exsudatos é evidente na maioria das análises realizadas, levando a crer que as proteínas exsudadas não participam dos mecanismos convencionais relacionados à resistência de cultivares, os quais têm como base a penetração ou não dos juvenis em raízes (HERMAN *et al.*, 1991; CAMPOS *et al.*, 2006).

Por outro lado, os efeitos inibitórios sobre *M. incognita* se mostraram dependentes da quantidade de proteínas exsudadas dispostas em cada ensaio e do tempo de exposição dos nematoides a estas. Quando considerada a fase infectiva (J2), a atividade inibitória está

relacionada, primeiramente, à redução da mobilidade dos juvenis, o que pode ser observado no tempo de 24 horas de exposição ao exsudato. Para a concentração de 0,06 mg/mL, após a inibição da mobilidade de cerca de 90% da população, grande parte desta foi revertida com a diluição da amostra. No entanto, o aumento da concentração de proteínas utilizadas no ensaio foi capaz de diminuir essa taxa de recuperação, com o exsudato da cultivar BRS-Pala causando 51% de mortalidade dos J2 na concentração de 0,5 mg/mL. Ainda que a imobilização observada seja temporária, reflexos negativos se fazem permanentes na infectividade do patógeno (ROCHA; CAMPOS, 2003). Essa relação é corroborada pelo achado experimental que, *in vivo*, mostra a redução dos números de galhas e massas de ovos de plantas de tabaco infectadas por juvenis tratados com exsudato da cultivar BRS-Pala.

A atividade anti-nematoide dos exsudatos de soja se mostra ainda promissora pelos seus efeitos sobre mais de uma fase do ciclo de vida do parasita. As proteínas exsudadas por sementes de soja também foram capazes de inibir a eclosão de ovos de *M. incognita*, uns dos estágios mais resistentes do seu ciclo de vida, visto à presença de uma casca de três camadas (MENNAN; MELAKEBERHAN, 2006).

As moléculas responsáveis pela atividade biológica relatada não foram precisamente identificadas. No entanto, vários são os relatos acerca de proteínas com atividade nematicida (CHITWOOD, 2002; ROCHA *et al.*, 2006), estando duas delas presentes nos exsudatos de soja analisados, compreendendo inibidor de proteinases cisteínicas e lectina.

Inibidores de proteinases cisteínicas, tais como fitocistatinas, estão associadas ao controle do desenvolvimento da relação de parasitismo por um patógeno. Proteases cisteínicas funcionam como enzimas digestivas durante todo o ciclo de vida de *M. incognita* (MICHAUD *et al.*, 1996; NEVEU *et al.*, 2003; SHINGLES *et al.*, 2007). Aliado a isso, proteínas com propriedade de inibição dessas enzimas afetam o crescimento, frequência e fecundidade dos indivíduos desta espécie (ATKINSON *et al.*, 2003). Adicionalmente, o mecanismo de ação específico desses inibidores para nematoides constitui-se na sua interação com moléculas semelhantes à papaína na cutícula do mesmo (ANDRADE *et al.*, 2010).

Por sua vez, lectinas são associadas à defesa contra nematelmintos, pois dificultam a penetração de nematoides nas raízes, com conseqüente diminuição da formação de galhas (WALACE, 1963). Alguns dos mecanismos inibitórios sobre nematoides que têm sido propostos para as lectinas consistem na sua ligação a glicoproteínas presentes no sistema digestório destes animais, exercendo um efeito antinutricional ou, ainda, no bloqueio de

quimiorreceptores nas cutículas de juvenis, dificultando a motilidade destes, além de prejudicar sua capacidade de localizar a planta (MARBAN-MENDONZA *et al.*, 1987; POWELL *et al.*, 1998; FITCHES *et al.*, 2001).

A SBA, ligante aos resíduos de D-galactose e *N*-acetil-D-galactosamina, já se mostrou capaz de interagir com anfídios, estruturas sensoriais quimiorreceptoras localizadas na cabeça do nematelminto, bem como com secreções de J2 de nematoides do gênero *Meloidogyne* (DAVIS *et al.*, 1988). Sua ação em exsudatos de soja parece então estar associada à imobilização temporária dos J2. Adicionalmente, evidências sugerem a participação dessa proteína na repelência da fase infectiva, por parte dos exsudatos de soja, visto sua atividade inibitória na quimioatração já ter sido relatada em larvas de terceiro estágio de *Strongyloides ratti* (TOBATA-KUDO *et al.*, 2005).

Diante do exposto neste trabalho, proteínas exsudadas por soja parecem estar mais envolvidas em mecanismos de prevenção da penetração de J2 de *M. incognita*, não participando, portanto, dos mecanismos convencionais relacionados à definição de resistência ou não de cultivares.

7. CONCLUSÃO

As composições dos exsudatos das sementes de soja das cultivares BRS-Pala e BRS-Macota caracterizam-se por apresentar várias proteínas relacionadas à defesa vegetal. Entretanto, nos parâmetros utilizados, é no exsudato da cultivar BRS-Pala que a maioria dessas proteínas, é mais elevada. Algumas dessas proteínas parecem estar envolvidas em mecanismos de prevenção da penetração de juvenis de segundo estágio do nematoide *M. incognita*. O conjunto de dados reforça a ideia de que a exsudação de sementes de soja pode ser vista como um evento de proteção da germinação e estabelecimento da plântula, particularmente contra nematoides de solo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, M.; Abe, K.; Kuroda, M.; Arai, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**. v. 209, p. 933-937, 1992.

Adams, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**. v. 150, p. 2029–2035, 2004.

Agizzio, A. P.; Carvalho, A. O.; Ribeiro, S. F. F.; Machado, O. L. T.; Alves, E. W.; Okorokov, L. A.; Samarão, S. S.; Bloch Jr.; C., Prates, M. V.; Gomes, V. M. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. v. 416, p.188-195, 2003.

Agrawal, A.A. Macroevolution of plant defense strategies. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 22, p. 103–109, 2007.

Agrawal, G.K.; Jwa, N.S.; Rakwal, R. Rice proteomics: ending phase I and the beginning of phase II. **Proteomics**. v. 9, p. 935-963, 2009.

Agrawal, G. K.; Jwa, N. S.; Lebrun, M. H.; Job, D.; Rakwal, R. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. **Proteomics**. v. 10, p. 799–827, 2010.

Alban, A.; David, S.O.; Bjorkesten, L.; Andersson, C.; Sloge, E.; Lewis, S.; Currie, I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. **Proteomics**. v. 3, p. 36–44, 2003.

Almeida, A.M.R.; Ferreira, L.P.; Yorinori, J.T.; Silva, J.F.V.; Henning, A.A.; Godoy, C.V.; Costamilan, L.M.; Meyer, M.C. Doenças da soja (*Glycine max*). Em: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. 4^a ed. Ceres. Piracicab, SP. pp. 569-588, 2005.

Andrade, L. B. S. **Inibidores de proteases cisteínicas de raízes de *Crotalaria pallida*: Isolamento, purificação, caracterização e avaliação de sua ação contra *Meloidogyne incognita***. 2008. 191 f. Tese – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Andrade, L. B. S.; Oliveira, A. S.; Ribeiro, J. K. C.; Kiyota, S.; Vasconcelos, I. M.; Oliveira, J. T. A.; Sales, M. P. Effects of a novel pathogenesis-related class 10 (PR-10) protein from *Crotalaria pallida* roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 4145-4152, 2010.

Andres, M.F.; Gonzalez-Coloma, A.; Sanz, J.; Burillo J.; Sainz, P. Nematicidal activity of essential oils: A review. **Phytochemistry Reviews**. v. 11, p. 371-390, 2013.

Asano, M.; Okubo, K.; Yamauchi, F. Effect of immersing temperature on the behavior of exuding compounds from soybean. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**. v. 36, p. 636–642, 1989.

Audfray, A.; Claudinon, J.; Abounit, S.; Ruvoën-Clouet, N.; Larson, G.; Smith, D. F.; Wimmerová, M.; Le Pendu, J.; Römer, W.; Varrot, A.; Imberty, A. Fucose-binding lectin from opportunistic pathogen *Burkholderia ambifaria* binds to both plant and human oligosaccharidic epitopes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 287, p. 4335–4247, 2012.

Atkinson, H.J.; Urwin, P.E.; McPherson, M.J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v. 41, p. 615–639, 2003.

Baek, J.M.; Song, J.C.; Choi, Y.D.; Kim, S.I. Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoinhibitors. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 58, p. 843-846, 1994.

Bakker, J. Current state of nematicides. Em: Zadoks, J. C. Modern crop protection: development and perspectives. Wageningen: Agricultural University Press. p. 21-26, 1993.

Ballarin, M. C. C. Nutrição mineral y abonado para cultivo en substratos de baja actividad química. Em: Barbosa, J.G.; Martinez, H. E. P.; Pedrosa, M.W.; Sediyaama, M. A. N. Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato – IV ENSUB (Encontro Nacional sobre Substratos para Plantas). p. 92-105, 2004.

Baldwin, M. A. Protein identification by mass spectrometry: Issues to be considered. **Molecular and Cellular Proteomics**. v. 3, p. 1–9, 2004.

Bannai, H.; Tamada, Y.; Maruyama, O.; Nakai, K.; Miyano, S. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. **Bioinformatics**. v. 18, p. 298–305, 2002.

Barbour, W. M.; Hatterman, D. R.; Stacey, G. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, p. 2625–2639, 1991.

Bhatia, V. N.; Perlman, D. H.; Costello, C.E.; McComb, M.E. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. **Analytical Chemistry**. v. 23, p. 9819-9823, 2009.

Bewley, J.D.; Black, M. Seeds: physiology of development and germination. 2ª edição. Nova Iorque: Plenum Press, 1994.

Blackstock, W., Mann, M., Proteomics: A Trends Guide. Elsevier, Amsterdam, 2000.

Boller, T., Gurr, S. J., Mc Pherson, M. J., Bowles, D. J. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. **Molecular Plant Pathology**. Eds. IRL Press, New York, p. 23-29, 1993.

Boothe, J.; Nykiforuk, C.; Shen, Y.; Zaplachinski, S.; Szarka, S.; Kuhlman, P.; Murray, E.; Morck, D.; Moloney, M.M. Seed-based expression systems for plant molecular farming. **Plant Biotechnology Journal**. v. 8, p. 588–606, 2010.

Bowles, D. J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**. v. 59, p. 837-907, 1990.

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

Brunner, F.; Stintzi, A.; Fritig, B.; Legrand, M. Substrate specificities of tobacco chitinases. **Plant Journal**. v. 14, p. 225-234, 1998.

Bendtsen, J.D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**. v. 340, p. 783-795, 2004.

Bendtsen, J.D.; Jensen, L.J.; Blom, N.; Von Heijne, G.; Brunak, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. **Protein Engineering, Design and Selection**. v. 17, p. 349-356, 2004.

Brash A.R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p. 23679-23682, 1999.

Bueno, P.R.R.; Guerreiro, J.C.; Brass, F.E.B.; Cervigni, G. Primeiro relato de ocorrência do nematoide *Meloidogyne mayaguensis* em acerola, na região de Garça, SP. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. v. 12, 2007.

Burton, J. W. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**. v. 53, p. 171-186, 1997.

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

Cândido, E. S.; Pinto, M.F.; Pelegrini, P.B.; Lima, T.B.; Silva, O.N.; Pogue, R., Grossi-de-Sá, M.F., Franco, O.L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **FASEB Journal**.v. 25, p.3290–3305, 2011.

Carlini, C.R.; Grossi-de-Sá, M.F. Plant Toxic Proteins with Insecticidal Properties. A Review on their Potentialities as Bioinsecticides. **Toxicon**. v. 40, p. 1515-1539, 2002.

Carrão-panizzi, M.C.; Kwanyuen, P.; Erhan, S.Z.; Lopes, I.O.N. Genetic variation and environmental effects on beta-conglycinin and glycinin content in Brazilian soybean cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.43, p.1105- 1114, 2008.

Charro, N.; Hood, B. L.; Faria, D.; Pacheco, P.; Azevedo, P.; Lopes, C.; de Almeida, A.B.; Couto, F. M.; Conrads, T. P.; Penque, D. Serum proteomics signature of cystic fibrosis patients: a complementary 2-DE and LC-MS/MS approach. **Journal of Proteomics**. v. 74, p. 110-26, 2011.

Cheng, F.; Williamson, J.D. Is there leaderless protein secretion in plants? **Plant Signal Behavior**. v. 5, p. 129-131, 2010.

Chitwood, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review Phytopathology**. v. 40, p. 221-249, 2002.

Cho, T.J.; Davies, C.S.; Nielsen, N.C. Inheritance and Organization of Glycinin Genes in Soybean. **Plant Cell**. v. 1, p. 329-337, 1989.

Coimbra, J. L., Campos, V.P. Efeito de exsudados de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, p. 232-238, 2005.

Creelman, R.A.; Mullet, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 48, p. 355-381, 1997.

Cristóbal-Alejo, J.; Tun-Suárez, J.M.; Moguel-Catzín, S.; Marbán-Mendoza, N.; Medina-Baizabal, L.; Simá-Polanco, P.; Peraza-Sánchez, S.R.; Gamboa-Ângulo, M.M. *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. **Nematropica**. v. 36, p. 89-97, 2006.

Cunha, N. B.; Araújo, A.C.G.; Leite, A.; Murad, A. M.; Vianna, G. R.; Rech, E. L. Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. **Genetics and Molecular Research**. v. 9, p. 1163-1170, 2010.

Croft, K.P.C.; Juttner, F.; Slusarenko, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. **Plant Physiology**. v. 101, p. 13-24, 1993.

Davies, K.G.; Kerry, B.R.; Flynn, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**. v. 112, p. 1491-1501, 1988.

Dias, W. P.; Garcia, A.; Silva, J. F. V.; Carneiro, G. E. S. Nematoides em Soja: Identificação e Controle. **Circular Técnica 76**. Embrapa, 2010.

Dickinson, C.D.; Hussein, E.H.; Nielsen, N.C. Role of posttranslational cleavage in glycinin assembly. **Plant Cell**. v. 1, p. 459-469, 1989.

Dossey, Z. **Potential of green manure biofumigants and seed exudates in the control of *Globodera pallida*, the white potato cyst nematode**. 2010. Dissertação (Mestrado em Patologia de Plantas) - Washington State University, Washington, USA.

Doyle, J. J.; Luckow, M. A. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**. v. 131, p. 900–910, 2003.

Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; von Heijne, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**. v. 300, p. 1005–1016, 2000.

Engel, S.; Jensen, P. R.; Fenical, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**. v. 28, p. 1971-1985, 2002.

Engler, J. A.; van Poucke, K.; Karimi, M.; de Groot, R.; Gheysen, G.; Engler, G.; Gheysen, G. Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infested roots. **The Plant Journal**. v. 38, p. 12-26, 2004.

Evans, K.; Trudgill, D. L.; Webster, J. M. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. Wallingford: CAB International, 648 p. 1993.

Fan, J.; Mohareb, F.; Jones, A. M.; Bessant, C. MRmaid: The SRM assay design tool for *Arabidopsis* and other species. **Frontiers in Plant Science**. v. 3, p. 164, 2012.

Ferraz, S.; Freitas, L.G. Use of antagonistic plants and natural products. Em: Chen, Z.; Chen, S.; Dickinson, D.W. Nematology – Advances and Perspectives. Volume II: Nematode Management and Utilization. Tsinghua University Press & CABI Publishing. p. 931-978, 2004.

Ferreira, A. G.; Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 323 p., 2004.

Fountain, D.W.; Foard, D.E.; Replogle, W.D.; Yang, W.K. Lectin release by soybean seeds. **Science**. v. 197, p. 1185–1187, 1977.

Freeman, B.; Beattie, G. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. The Plant Health Instructor. 2008. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx>

Finamore, F.; Pieroni, L.; Ronci, M.; Marzano, V.; Mortera, S.L.; Romano, M.; Cortese, C.; Federici, G.; Urbani, A. Proteomics investigation of human platelets by shotgun nUPLC-MSE and 2DE experimental strategies: a comparative study. **Blood Transfusion**. v. 8, p. 140-148, 2010.

Fitches, E.; Woodhouse, S. D.; Edwards, J. P.; Gatehouse, J. A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**. v. 47, p. 777-787, 2001.

Gallardo, K.; Thompson, R.D.; Burstin, J. Reserve accumulation in legume seeds. **Comptes Rendus Biology**. v. 331, p. 755–762, 2008.

Gepts, P.; Beavis, W. D.; Brummer, E. C.; Shoemaker, R. C.; Stalker, H. T.; Weeden, N. F.; Young, N. D. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. **Plant Physiology**. v. 137, p. 1228–1235, 2005.

Germani, G.; Plenchette, C. Potential of *Crotalaria* species as green manure crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**. v. 266, p. 333-342, 2004.

Gierasch, L. M. Signal sequences. **Biochemistry**. v. 28, p. 923-930, 1989.

Gorg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**. v. 21, p. 1037-1053, 2000

Goverse, A.; Overmars, H.; Engelbertink, J.; Schots, A.; Bakker, J.; Helder, J. Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. **Molecular Plant-Microbe Interaction**. v. 13, p. 1121–1129, 2000.

Graves, P.R.; Haystead, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology & Molecular Biology Review**. v. 66, p. 39–63, 2002.

Gue'guen, J.; Cerletti, P. Proteins of some legume seeds: soybean, pea, fababean and lupin. Em: Hudson, B. J. F. New and developing sources of food proteins. New York: Chapman & Hall p. 145-193, 1994.

Gupta, P.K., Rustgi S., Kumar, N. Genetic and molecular basis of grain size and grain number and its relevance to grain productivity in higher plants. **Genome**. v. 49, p. 565–571, 2006.

Gururani, M.A.; Venkatesh, J.; Upadhyaya, C.P.; Nookaraju, A.; Pandey, S.K.; Park, S.W. Plant disease resistance genes: current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 78, p. 51–65, 2012.

Hagan, A. K. Soilborne diseases of peanut. **Cooperative Extension Service Publication**. n. ANR0368, 1998.

Hai, A.; Kizilbash, N.A.; Alruwaili, J. Proteomics technology as an investigative tool in plant science. **Global Advanced Research Journal of Biotechnology**. v. 2, p. 013-016, 2013.

Hall, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**. v. 169, p. 453-468, 2006.

Hamerstrand, G. E.; Black, L. T.; Glover, J. D. Trypsin inhibitor in soy products: modification of the standard analysis procedure. **Cereal Chemistry**. v. 58, p. 42-45, 1981.

Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 431, p. 145–159, 2004.

Heath, M. Non host resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**. v.3, p. 315–319, 2000.

Hejgaard, J.; Jacobsen, S.; Svendsen, I. Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. **FEBS Letters**. v. 7, p. 127–131, 1991.

Herman, E.M.; Helm, R.M.; Jung, R.; Kinney, A.J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. **Plant Physiology**. v. 132, p. 36–43, 2003.

Hirano, H.; Kagawa, H.; Okubo, K. Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. **Phytochemistry**. v. 31, p. 731-735, 1992.

Hirsch, P.R. Release of transgenic bacterial inoculants - rhizobia as a case study. **Plant & Soil**. v. 266, p. 1-10, 2004.

Hussey, R.S.; Barker, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. **Plant Disease Management Reports**. v. 57, p. 1025–1028, 1973.

Jatala, P. Biology control of nematodes. Em: Sasser, J. N.; Carter, C. C. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. vol. I. Biology and control. North Carolina: University Graphics, p. 303- 308, 1985.

Jensen, E.S.; Hauggaard-Nielsen, H. How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? **Plant and Soil**. v. 252, p. 177–186, 2003.

Jolliffe, N.A.; Craddock, C.P.; Frigerio, L. Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. **Biochemical Society Transactions**. v. 33, p.1016-1018, 2005.

Kakade, M. L.; Simons, N.; Liener, I. E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean sample. **Cereal Chemistry**. v. 46, p. 518-526, 1969.

Kämpf, A.N. Seleção de materiais para uso como substrato. Em: Kämpf, A.N.; Fermino, M. H. Substratos para Plantas: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Genesis, p. 139-146, 2000.

Keller, M.; Rüegg, A.; Werner, S.; Beer, H.D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**. v. 132, p. 818-831, 2008.

Kinloch, R.A. Screening for resistance to root-knot nematodes. Em: Starr, J. L. Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes. Hyattsville. p. 16–28, 1990.

Kinney, A.J. Plants as industrial chemical factories—new oils from genetically engineered soybeans. **Fett Lipid**. v. 100, p. 173–176, 1998.

Komatsu, S.; Ahsan, N. Soybean proteomics and its application to functional analysis. **Journal of Proteomics**. v. 72, p. 325–336, 2009.

Komiyama, A.; Sano, Z.; Murata, T.; Matsuda, Y.; Yoshida, M.; Saito, A.; Okada, Y. Resistance to two races of *Meloidogyne incognita* and resistance mechanism in diploid *Ipomoea trifida*. **Breeding Science**. v. 56, p. 81–83, 2006.

Krishnan, H.B.; Nelson, R.L. Proteomic analysis of high protein soybean (*Glycine max*) accessions demonstrates the contribution of novel glycinin subunits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 2432-2439, 2011.

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

Lambert, K. N.; Allen, K. D.; Sussex, I. M. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**. v. 12, p. 328-336, 1999.

Le, B.H.; Wagmaister, J.A.; Kawashima, T.; Bui, A.Q.; Harada, J.J.; Goldberg, R.B. Using genomics to study legume seed development. **Plant Physiology**. v. 144, p. 562–574, 2007.

Liavonchanka, A.; Feussner, I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. **Journal of Plant Physiology**. v.163, 348-357, 2006

Lis, H. Sharon, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**. v. 42, p. 41-74, 1973.

Liu, Y.; Li, J. An in vivo investigation of amino acid residues critical for the lectin function of *Arabidopsis* calreticulin 3. **Molecular Plant**. v. 6, p. 985–987, 2013.

Luc, M., Bridge, J. e Sikora, R.A. Reflections on nematology in subtropical and tropical agriculture. Em: Luc, M., Sikora, R.A. e Bridge, J. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. p. 11-17, 1990.

Ma, J.K.; Drake, P.M.; Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**. v. 4, p. 794-805, 2003.

Ma, Y.; Wang, T.; Faris, R.; Spurlock, M. In Vitro Hemagglutination Activity of β -Conglycinin and Glycinin Fractions and Feeding Study of Non-Thermal Treated Soy Protein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 88, p. 983-992, 2011.

Marban-Mendoza, N.; A. Jeyaprakash; H. Jansson; R. Damon; B. M. Zuckerman. Control of root-knot nematode on tomato by lectins. **Journal of Nematology**. v. 19, p. 331-333, 1987.

Matos, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental, 2ª edição. Editora UFC, 1999.

Mckey, D.; Rosenthal, G.A.; Janzen, D.H. Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. **Academic Press**. 1979.

Mel'nikova, N. N.; Omel'chuk, S. V. Effect of legume seed exudates on the formation of Rhizobium-legume symbiosis. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 45, p. 297-302, 2009.

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

Michaud, D.; Cantin, L.; Bonade-Bottino, M.; Jouanin, L.; Vrain, T.C. Identification of stable plant cystatin/nematode proteinase complexes using mildly denaturing gelatin/polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 17, p. 1373–1379, 1996.

Molan, A. L.; Alexander, R.; Brookas, I. M.; McNabb, W. C. Effects of sulla condensed tannins on the viability of three sheep gastrointestinal nematodes. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**. v. 60, p. 21-25, 2000.

Molina, A. Peptídeos antimicrobianos e imunidade inata em plantas. **Bio Press net**. v. 7, 2003.

Mooney, B. P.; Krishnan, H. B.; Thelen, J.J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. **Phytochemistry**. v. 65, p. 1733-1744, 2004.

- Moreira, R. A.; Perrone, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 783-787, 1977.
- Moreira, R.A.; Castelo-Branco, C.C.; Monteiro, A.C.O.; Tavares, R. O.; Beltramini, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. Seeds. **Phytochemistry**. v. 47, p. 1183-1188, 1998.
- Muntz, K. Deposition of storage proteins. **Plant Molecular Biology**. v. 38, p. 77–99, 1998.
- Murad, W.; Singh, R.; Yen, T.-Y. An efficient algorithmic approach for mass spectrometry-based disulfide connectivity determination using multi-ion analysis. **BMC Bioinformatics**. v. 12, 2011.
- Murad, A. M.; Rech, E. L. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnology**. v. 12, p. 82, 2012.
- Natarajan, N.; Cork, A.; Boomathi, R.; Pandi, R.; Velavan, S.; Dhakshnamoorthy, G. Cold aqueous extracts of African marigold, *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**. v. 25, p. 1210-1213, 2006.
- Nelson, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seed and roots. **Plant and Soil**. v. 129, p. 61-73, 1990.
- Nelson, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review of Phytopathology**. v. 42, p. 271-309, 2004.
- Neveu, C.; Abad, P.; Castagnone-Sereno, P. Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant–parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 63, p. 159–165, 2003.
- Nielsen, N.C.; Dickinson, C.D.; Cho, T.-J.; Thanh, V.H.; Scallon, B.J.; Sims, T.L.; Fischer, R.L.; Goldberg, R.B. Characterization of the glycinin gene family. **Plant Cell**. v. 1, p. 313-328, 1989.
- Nobrega, F. M.; Santos, I. S.; Da Cunha, M.; Carvalho, A.O.; Gomes, V. M. Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein. **Plant Soil**. v. 272, p. 223-232, 2005.

Noling, J. W.; Becker, J. O. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. **Supplement to the Journal of Nematology**. v. 26, p. 573-586, 1994.

Nyczepir, A. P.; Thomas, S. H. Current and future management strategies in intensive crop production systems. Em: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. *Root-Knot Nematodes*. Wallingford, Oxfordshire, UK. CABI. p. 412-443, 2009.

O'Brian, M.R.; Vance, C.P.; Vandenbosch, K.A. Legume focus: model species sequenced, mutagenesis approaches extended, and debut of a new model. **Plant Physiology**. v. 151, p.969, 2009.

Okubara, P.A.; Paulitz, T.C. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. **Plant Soil**. v. 274, p. 215-226, 2005.

Oliveira, H. D. **Toxinas protéicas de sementes de soja [*Glycine Max (L.) Merr.*]: aspectos moleculares e funcionais**. 2009. 205f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Ong, S. E.; Pandey, A. An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering**. v. 18, p. 195-205, 2001.

Palavalli, M. H.; Natarajan, S. S.; Wang, T. T.; Krishnan, H. B. Imbibition of Soybean Seeds in Warm Water Results in the Release of Copious Amounts of Bowman–Birk Protease Inhibitor, a Putative Anticarcinogenic Agent. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 60, p. 3135-3143, 2012.

Parchmann, S.; Gundlach, H.; Mueller, M.J. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. **Plant Physiology**. v. 115, p. 1057–1064, 1997.

Powell, W.; Pennacchio, F.; Poppy, G. M.; Tremblay, E. Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). **Biological Control**. v. 11, p. 104-112, 1998.

Quentin, M.; Abad, P.; Favery, B. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. **Frontiers in Plant Science**. v. 4, p. 53, 2013.

- Reissig, J.L.; Strominger, J.L.; LeLoir, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **Journal of Biological Chemistry**. v. 217, p.959 – 966, 1955.
- Renkema, J.M.S.; Knabben, J.H.M.; van Vliet, T. Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures. **Food Hydrocolloids**. v. 15, p. 407-414, 2001.
- Renny-Byfield, S.; Chester, M.; Kovar, A.; Le Comber, S. C.; Grandbastien, M.A.; Deloger, M.; Nichols, R.A.; Macas, J.; Novák, P.; Chase, M.W.; Leitch, A.R. Next Generation Sequencing Reveals Genome Downsizing in Allotetraploid *Nicotiana tabacum* Predominantly through the Elimination of Paternally Derived Repetitive DNAs. **Molecular Biology and Evolution**. v. 28, p. 2843-2854, 2011
- Reuzeau, C.; Cavalié, G. Changes in RNA and Protein Metabolism Associated with Alteration in the Germination Efficiency of Sunflower Seeds. **Annals of Botany**. v. 80, p.131-137, 1997.
- Ricks, J.J.; Sasame, H.A.; Man, R.K.; Anderson, R.L.; Smith, A.K. Soybean trypsin inhibitors: isolation, purification and physical properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 98, p. 471-478, 1962.
- Riga, E.; Hooper, C.; Potter, J. In vitro effect of marigold seed exudates on plant parasitic nematodes. **Phytoprotection**. v. 86, p. 31-35, 2005.
- Ritonja, A.; Krizai, I.; Mesko, P.; Kopitar, M.; Lucovnik, P.; Strukelj, B.; Pungercar, J.; Buttle, D.J.; Barrett, A.J.; Turk, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Letters**. v. 267, p. 13-15, 1990.
- Roberts, W.K.; Selitrennikoff, C.P. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. **Journal of General Microbiology**. v. 136, p. 1771–1778, 1990.
- Rocha, F.S.; Campos, V.P. Efeito de baixa dose de aldicarbe nos processos de eclosão a penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**. v. 27, p. 185-192, 2003.

Rocha, T. L.; Murad, A. M.; Evaristo, R. G. S; Almeida, W. S.; Magalhães, J. C. C.; Mattar, M. C. S.; Grossi-de-Sá, M. F. Efeito nematicida de extratos aquosos de sementes de plantas sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Comunicado técnico 144**. Embrapa. 2006.

Rocha R.O. **Exsudatos de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: caracterização e efeitos contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita***. 2011. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Rose, T.L.; Conceição, A.S.; Xavier-Filho, J.; Okorov, L.A.; Fernandes, K.V.S.; Marty, F.; Marty-Mazars, D.; Carvalho, A.O.; Gomes, V.M. Defense proteins from *Vigna unguiculata* seed exudates: characterization and inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*. **Plant Soil**, v. 286, p. 181-191, 2006.

Rose, J. K. C.; Lee, S. J. Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. **Plant Physiology**. v. 153, p. 433–436, 2010.

Santos, P.O.; Santos, I. S.; Gomes, V. M.; Machado, O. L. T.; Fernandes, K. V. S.; Xavier-Filho, J.; Oliveira, A. E. A. *In vitro* evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. **Journal of Stored Products Research**. v. 44, p. 310-315, 2008.

Santos, J. M.; Soares, P. L. M. Nematoides em soja. **Revista Plantio Direto**. v. 121, 2011.

Sasser, J.N. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. **Journal of Nematology**. v. 22, p. 585–589, 1977.

Sasser, J.N.; Carter, C.C. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Identification, morphological and physiological variation, host range, ecology and control. Em: Riggs, R.D. Nematology in the Southern Region of the United State p. 21-32, 1982.

Scarafoni, A.; Ronchi, A.; Prinsi, B.; Espen, L., Assante, G.; Venturini, G.; Duranti, M. The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. **FEBS J**. v. 280, p. 1443-1459, 2013.

Schägger, 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, p. 368-379, 1987.

Schmutz, J.; Cannon, S.B.; Schlueter, J.; Ma, J.X.; Mitros, T.; Nelson, W.; Hyten, D.L.; Song, Q.J.; Thelen, J.J.; Cheng, J.L.; Xu, D.; Hellsten, U.; May, G.D.; Yu, Y.S.; Sakurai, T.; Umezawa, T.; Bhattacharyya, M.K.; Sandhu, D.; Valliyodan, B.; Lindquist, E.; Peto, M.; Grant, D.; Shu, S.Q.; Goodstein, D.; Barry, K.; Futrell-Griggs, M. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**. v. 463, p. 178-183, 2010.

Sela-Buurlage, M.B.; Ponstein, A.S.; Bres-Vloemans, S.A.; Melchers, L.S.; Van den Elzen, P.J.M.; Cornelissen, B.J.C. Only specific tobacco (*Nicotiana glauca*) chitinases and P-1,3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**. v. 101, p. 857-863, 1993.

Siedow, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 145–188, 1991.

Simões, K. **Substâncias fitotóxicas e antifúngicas em sementes de leguminosas que acumulam galactomanano e xiloglucano como carboidratos de reservas de parede celular**. 2008. 220 f. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

Shah, D.M.; Rommens, C.M.; Beachy, R.N. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. **Trends in Biotechnology**. v. 13, p. 362–368, 1995.

Sharon, N.; Lis, H. Lectins, 2nd ed. Kluwer Scientific Publishers, Amsterdam, 2003.

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

Song, Y.; Love, M.H.; Muphy, P. Subcellular localization of lipoxygenase-1 and -2 in germinating soybean seeds and seedlings. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 67, p. 961-965, 1990.

Sorribas J.; Ornat, C. Estrategias de control integrado de nematodos fitoparásitos. Em: Andrés, M.F.; Verdejo, S. Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos em Espanã. pp 115–127, 2011.

Stanton-Geddes, J.; Paape, T.; Epstein, B.; Briskine, R.; Yoder, J. B.; Mudge, J.; Bharti, A. K.; Farmer, A. D.; Zhou, P.; Denny, R.; May, G. D.; Erlandson, S.; Yakub, M.; Sugawara, M.; Sadowsky, M. J.; Young, N. D.; Tiffin, P. Candidate genes and genetic architecture revealed by whole-genome, sequence-based association genetics in *Medicago truncatula*. **PLoS One**. v. 8, p. 656-688, 2013.

Steen, H.; Mann, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 5, p. 699-711, 2004.

Strauss, S.Y.; Irwin, R.E.; Lambrix, V.M. Optimal defence theory and flower petal colour predict variation in the secondary chemistry of wild radish. **Journal of Ecology**. v. 92, p. 132-141, 2004.

Teixeira-Sá, D. M. A.; Reicher, F.; Braga, R. C.; Beltramini, L. M.; de Azevedo Moreira, R. Isolation of a lectin and a galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei* seeds. **Phytochemistry**. v. 70, p. 1965-1972, 2009.

Terras, F.R.G.; Eggermont, K.; Kovaleva; V. Raikhel, N.V.; Osborn., R.W.; Kester, A.; Rees, S.B.; Torrekens, S.; Van Leuven, F.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.P.A.; Broekaert, W.F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **Plant Cell**. v. 7, p. 573-588, 1995.

The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**. v. 408, p. 796-815, 2000.

Thomason, I.J. Challenges facing nematology: environmental risks with nematicides and the need for new approaches. Em: Veech, J. A.; Dickson, D.W. *Vistas on nematology*, p. 469-476. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987.

Tobata-Kudo, H.; Kudo, H.; Tada, I. Strongyloides ratti: Chemokinesis of glycolytic enzyme- and lectin-treated third-stage infective larvae in vitro. **Parasitology International**. v. 54, p. 147-152, 2005.

Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E.; Herka H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**. v. 13, p.43-50. 1991.

Utsumi, S.; Matsumura, Y.; Mori, T. Structure–function relationships of soy proteins. Em: Damodaran, S.; Paraf, A. *Food Proteins and Their Applications*. New York: Marcel Dekker. pp. 257–291, 1997.

Van Damme, E.J.M.; Barre, A.; Rougé, P.; Peumans, W.J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends in Plant Science**. v. 9, p. 484–489, 2004.

Van der Hoorn, R. A. L.; Rivas, S.; Wulff, B. B. H.; Jones, J. D. G.; Joosten, M. H. A. J. Rapid migration in gel filtration of the Cf-4 and Cf-9 resistance proteins is an intrinsic property of Cf proteins and not because of their association with high-molecular-weight proteins. **The Plant Journal**. v.35, p. 305-315, 2003.

Vigers, A.J.; Roberts, W.K.; Selitrennikoff, C.P. A new family of plant antifungal proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 4, p. 315-323, 1991.

Vigers, A.J.; Wiedemann, S.; Roberts, W.K.; Legrand, M.; Selitrennikoff, C.P.; Fritig, B. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Science**. v. 83, p. 155-161, 1992.

Wallace, H. R. *The biology of plant parasitic nematodes*. Londres: Edward Arnold, 1963.

Wang, C.; Kevan, P. C.; Croft, J. U.; Hildebrand, D. F. Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in a lipid mobilization during soybean germination. **Plant Physiology**. v. 37, p. 497-501, 1999

Wang, T.L.; Domoney, C.; Hedley, C.L.; Casey, R., Grusak, M.A. Can we improve the nutritional quality of legume seeds? **Plant Physiology**. v. 131, p. 886–891, 2003.

Wang, C.; Lower, S.; Williamson, V. M. Application of pluronic gel to the study of root-knot nematode behaviour. **Nematology**. v. 11, p. 453-464, 2009.

Weber, H.; Chételat, A.; Caldelari, D.; Farmer, E.E. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. **Plant Cell**. v. 11, p. 485–493, 1999.

Wessels, J.G.H.; Sietsma, J.H. Fungal cell walls: a survey. Em: Tanner, W.; Loewus, F.A. *Plant carbohydrates II*. Encycl Plant Physiol, N Ser 13B. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 352–394, 1981.

- Westermeier, R. Electrophoresis in practice. Wiley-VCH, ISBN, Germany, 2001.
- Whitehead, A. G. Plant-parasitism nematodes: their importance and control. Em: Whitehead, A. G. Plant nematode control. Wallingord: CAB International, p. 1-12, 1997.
- Wojciechowski, M. F.; Lavin, M.; Sanderson, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**. v. 91, p. 1846-1862, 2004.
- Woloshuk, C. P.; Meulenhoff, J. S.; Sela-Buurlage, M.; van den Elzen, P. J. M.; Cornelissen, B. J. C. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. **Plant Cell**. v. 3, p. 619–628, 1991.
- Worrall, D.; Hird, R.; Paul, W.; Draper, J.; Scott, R. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. **Plant Cell**. v. 7, p. 759-771, 1992.
- Xavier-Filho, J.; Campos, F.; Maria, A. P.; Ary, B.; Silva, C. P.; Carvalho, M. M. M. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 37, p. 1139-1143, 1989.
- Xavier-Filho, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. **Organizações dos Estados Americanos**. p. 1-3, 1993.
- Young, L.D. Breeding for nematode resistance and tolerance. Em: Barker, K.R.; Pederson, G.A.; Windham, G.L. Plant and nematode interactions. Madison, WI: American Society of Agronomy. pp. 187–207, 1998.
- Zangerl, A.R.; Bazzaz, F.A. Theory and pattern in plant defense allocation. Em: R. S. Fritz & E.L. Simms. Plant resistance to herbivores and pathogens. Chicago: University of Chicago Press, 1993.
- Zhou, L.; Bokhari, S. A.; Dong, C. J.; Liu J. Y. Comparative proteomics analysis of the root apoplasts of rice seedlings in response to hydrogen peroxide. **PLoS ONE**. v. 6, 2011.

