

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Ureases de soja [*Glycine max* (L.) Merril]: expressão em tabaco  
(*Nicotiana tabacum*) e atividade fungicida e/ou fungistática**

ARLETE BEATRIZ BECKER RITT

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadores:

Giancarlo Pasquali

Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Porto Alegre, março de 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia e no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Giancarlo Pasquali e da Profa Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini. Os auxílios recebidos foram do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (MCT/PRONEX), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores **Célia** e **Giancarlo**, pela orientação, apoio, dedicação e confiança. Obrigada pela oportunidade de aprendizado e colaboração.

Às professoras Dra. Janette Palma Fett e Dra. Maria Helena B. Zanettini, pelo grande auxílio e importantes sugestões no decorrer do doutorado.

Aos chefes de laboratórios, professores Arthur Fett-Netto, Augusto Schrank, Marilene Vainstein, Carlos Termignoni, João A. P. Henriques, Janette Palma Fett, Maria Helena B. Zanettini, Arnaldo Zaha, por permitir a utilização de inúmeros equipamentos.

Ao Prof. Dr. José Tadeu Oliveira (UFC) e à Prof. Dra. Valdirene Moreira Gomes (UENF), que gentilmente cederam os fungos utilizados neste trabalho.

À Dra. Maria Fátima Grossi-de-Sá do Laboratório Planta-Praga, EMBRAPA-Cenargen (DF), que tão gentilmente me recebeu em seu laboratório e permitiu a realização de experimentos.

À Empresa Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda, por permitir utilizar equipamentos.

À Anne Helene, pela disponibilidade em ajudar, e contribuições no decorrer do doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Tóxicas: Martha, Vander, Roseli, Melissa, Deiber, Fernanda S., Fernanda M., Diogo, German, Rafael, Anne, Ângela, Juliana, Tiziano, Deise, Carolina, pela amizade, coleguismo e alto astral constante.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal: Felipe, Fernanda B., Fernanda S., Rochele, Pámela, Guilherme, Ana Paula, pela receptividade e ajuda.

À Heique e Jacque, pelos inúmeros cafés e bate-papos.

Ao Ruy, meu amigo de longa data, pelos nossos almoços de sábado, sempre animadíssimos.

Aos meus pais, **Romeu** e **Cacilda**, pelo apoio, confiança, carinho e compreensão pela distância.

Aos meus maravilhosos sobrinhos: Maxuel, Alan e Anderson, aos meus irmãos Ernani e Rogério, minhas cunhadas Rosane e Aceli, que mesmo distantes torceram por mim.

Às minha amigas: Clara, Adriane, Anagilda e Ivanice, pelos longos bate-papos à distância e e-mails. Também pela torcida.

À Silvia e Luciano, pela disposição em ajudar e pelo alto astral.

Um agradecimento muito especial à minha amiga (além de orientadora) Célia, que acreditou em mim e me recebeu com todo carinho. Sua confiança, paciência, dedicação foram sempre muito importantes. Muito obrigada!

...  
E ali logo em frente  
A esperar pela gente o futuro está  
E o futuro é uma astronave  
Que tentamos pilotar  
Não tem tempo nem piedade  
Nem tem hora de chegar  
Sem pedir licença  
Muda nossa vida  
E depois convida  
A rir ou chorar  
Nessa estrada não nos cabe  
Conhecer ou ver o que virá  
O fim dela ninguém sabe  
Bem ao certo onde vai dar  
Vamos todos numa linda passarela  
De uma aquarela  
Que um dia enfim  
Descolorirá

in "Aquarela" de Maurizio Fabrizio - Guido Morra  
- Toquinho - Vinicius de Moraes

**Ao futuro, e a todas as surpresas maravilhosas que ele ainda nos reserva!**

## ÍNDICE

Resumo	viii
Abstract	x
Introdução	11
1.1. Co-evolução inseto-planta	15
1.2. Sementes e os danos causados por fungos	15
1.3. Sementes de leguminosas como fonte de proteínas	18
1.3.1. A soja, uma semente de leguminosa importante	19
1.4. Proteínas tóxicas em sementes	20
1.4.1. Inibidores de enzimas hidrolíticas	20
1.4.2. Lectinas	24
1.4.3. Inibidores de $\alpha$ -amilases	28
1.5. As ureases	29
1.5.1. Ureases na semente do feijão-de-porco ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	32
1.5.2. Presença de ureases em semente de soja	34
1.5.3. Ureases: uma nova classe de proteínas de defesa	36
2. Objetivos	40
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos Específicos	40
2.1.1. Capítulo 1: Clonagem de um gene de urease da soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	41
3. Material e Métodos	42

4. Resultados	49
Capítulo 2: Artigo: Antifungal activity of plant and bacterial ureases	55
Capítulo 3: Artigo: Expression of soybean ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill) ubiquitous urease in tobacco ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) and antifungal activity of soyben ureases.	69
5. Discussão Geral	98
6. Conclusões	101
7. Perspectivas	106
8. Referências Bibliográficas	107
9. Anexos	137

## RESUMO

Ureases (EC 3.5.1.5) são amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas onde sua função biológica não é completamente conhecida. Acredita-se que ureases estejam envolvidas na biodisponibilidade de nitrogênio e mecanismos de defesa contra predadores e patógenos. Plantas de soja *Glycine max* (L.) Merrill contêm duas isoformas de urease. Neste trabalho, clonamos e seqüenciamos um fragmento de 300 pb que corresponde a uma região interna do gene de urease. Relatamos, também, a utilização de um gene de soja como modo de gerar resistência a doenças fúngicas em plantas. Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tobacum* var. Turkish) contendo o cDNA codificador completo da urease ubíqua de soja sob a regulação do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e do terminador do gene da nopalina sintase, foram geradas a partir da transformação de discos foliares por *Agrobacterium tumefaciens*. Extratos proteicos obtidos a partir das folhas das plantas transgênicas foram analisados quanto à atividade ureásica e à imunorreatividade contra anticorpos da urease do feijão-de-porco. A habilidade dos extratos proteicos em inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos foi comparada com a atividade fungicida da urease embrião-específica isolada de sementes tipo-selvagem. Nossos resultados demonstraram a atividade antifúngica de ambas as isoformas de urease e apresentaram uma correlação positiva entre a inibição do crescimento de fungos e o conteúdo/atividade da urease ubíqua de soja recombinante. Os dados sugerem que a superexpressão da urease, em plantas transgênicas, pode auxiliar na



resistência das plantas contra fungos fitopatogênicos, além de seus efeitos conhecidos sobre insetos.

## ABSTRACT

Ureases (EC 3.5.1.5) are largely distributed in bacterial, fungi and plants, where their physiological role is not completely understood. It is thought that ureases are involved in nitrogen bioavailability and defense mechanisms against predators and pathogens. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants contain two isoforms of urease. Here we describe the cloning and sequencing of a fragment of 300 bp corresponding to an internal region of one of the soybean urease genes. Here we also reported the employment of a gene from soybean as a tool to confer resistance to fungal diseases in plants. Transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Turkish) plants harbouring the full length cDNA encoding the soybean ubiquitous urease under the control of the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter and the nopaline synthase gene (*nos*) terminator were obtained after leaf disc transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Leaf protein extracts of transgenic plants were analyzed for urease activity and immunoreactivity against antibodies to the jackbean urease. The ability of leaf protein extracts to impair growth of selected phytopathogens was compared to the fungicidal activity of the embryo-specific urease isolated from wild-type seeds. Our results demonstrated the antifungal activity of both soybean ureases and showed a positive correlation between the inhibition of fungal growth and content/activity of the recombinant soybean ubiquitous urease in leaves of transgenic tobacco. The data suggest that urease overexpression in transgenic plants may help to improve plant resistance against phytopathogenic fungi, besides its known effect on insects.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados do Banco Mundial, estima-se que atualmente a população mundial seja de cerca de 6 bilhões de habitantes. Com taxa de crescimento anual de 1,5%, em 2025, a população poderá chegar a 8,5 bilhões. Serão necessárias em torno de 350 milhões de toneladas de proteínas por ano para alimentá-la. Com a crescente queda do poder aquisitivo da população, principalmente nos países pobres e em desenvolvimento, o acesso a uma alimentação adequada torna-se cada vez mais difícil, em virtude do seu elevado custo. A utilização alimentar de proteínas animais está sendo cada vez mais substituída por proteínas de origem vegetal que, por serem sintetizadas por produtores primários, são mais baratas.

Nas últimas décadas, muitos avanços foram feitos para aumentar a produtividade agrícola mundial. O arroz teve sua produção mundial aumentada de 215 milhões de toneladas em 1961, para 590 milhões de toneladas em 2003. A soja, que em 1961 apresentava uma produção mundial em torno de 27 milhões de toneladas, teve sua produção aumentada para 190 milhões de toneladas em 2003 (FAO, <http://www.fao.org>).

Na agricultura moderna, em que a monocultura é a norma, milhares de indivíduos da mesma espécie convivem em grande proximidade física, o que constitui uma situação ecologicamente instável e que oferece uma arriscada oportunidade à invasão das lavouras por microrganismos patogênicos, plantas invasoras e insetos-praga. Com o objetivo de garantir os altos níveis de produção, mantendo as condições fitossanitárias das plantas cultivadas, diferentes

defensivos agrícolas ou agroquímicos, são aplicados contra os mais diversos tipos de pragas e doenças. Mas, o uso de agroquímicos também resulta em acréscimo de custos à produção, além de significantes problemas à saúde e ao meio ambiente.

Diminuir perdas é uma forma eficiente de aumento da produção agrícola. A perda mundial, devido a pestes e doenças, tem sido estimada em 37%; metade deste valor se deve à incidência de doenças fúngicas e 13% do total das perdas é devido ao ataque de insetos (HALL, 1991; GATEHOUSE *et al.*, 1992; LOGEMANN & SHELL, 1993). Atualmente, os métodos de proteção baseiam-se principalmente no uso de pesticidas químicos, que trazem benefícios mínimos com custo elevado, na ordem de bilhões de dólares ao ano. Estima-se que mais de 10 bilhões de dólares sejam gastos todos os anos para controle químico dos danos causados pelos insetos (KHUSH, 1999), resultando em uma redução de apenas 7% nas perdas causadas por artrópodes nas culturas (OERKE *et al.*, 1994). Por outro lado, esse tipo de controle acaba gerando muitos problemas ambientais graves, tais como a contaminação dos solos e das águas, a toxicidade sobre organismos não-alvo, o acúmulo em cadeias alimentares e problemas para a saúde humana (FRUTOS *et al.*, 1999).

O uso de controle biológico e de biopesticidas pode ser uma alternativa ao uso de agrotóxicos, pois baseia-se principalmente no uso de animais predadores, parasitas e/ou patógenos dos insetos-praga. Formulações baseadas na bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), um bacilo gram-positivo que sintetiza cristais de proteínas inseticidas durante a esporulação, representa o bioinseticida mais utilizado no mundo, sendo usada há mais de 50 anos no controle de insetos,

principalmente lepidópteros (MUSSER & SHELTON, 2003; CARRIERE *et al.*, 2003).

As principais proteínas de *Bt* com ação inseticida são as proteínas-cristal (Cry) (RUKMINI *et al.*, 2000). O mecanismo de ação deste biopesticida baseia-se na solubilização das proteínas Cry, presentes no esporo, no meio alcalino do intestino dos insetos. As pró-toxinas são convertidas em fragmentos tóxicos pela ação das enzimas digestivas dos insetos susceptíveis e, posteriormente, ligam-se à superfície das células epiteliais, induzindo lesões que destroem as células e matam o inseto (KNOWLES & DOW, 1993). O processo de ativação *in vivo* destas proteínas ainda não é totalmente conhecido e pode variar de acordo com as proteases presentes no intestino dos insetos (MIRANDA *et al.*, 2001), ocorrendo somente em insetos que possuem trato digestório alcalino e enzimas digestivas do tipo tripsina.

Há mais de 20 anos, preparações de esporos e cristais de *Bt* vêm sendo usadas como inseticidas comerciais. A maior vantagem destas formulações é que, aparentemente, as mesmas não afetam os seres humanos, mamíferos e a fauna não-alvo. As toxinas possuem atividade contra um determinado grupo de insetos, com pouco ou nenhum efeito sobre insetos não-alvo (QAIM & ZILBERMAN, 2003). No entanto, a baixa persistência na planta, e problemas de formulação tornam relativamente limitada a sua utilização (JOUANIN *et al.*, 1998).

A tecnologia do DNA recombinante abriu novas perspectivas de utilização de certas proteínas tóxicas, utilizadas como potentes inseticidas não poluidores do meio ambiente, possibilitando a obtenção de plantas transgênicas resistentes ao ataque de fitopatógenos ou insetos fitófagos. Um dos marcos pioneiros desta nova

abordagem foi o desenvolvimento pelo grupo de Mark Van Montagu na Bélgica, de plantas de tabaco e tomateiros transgênicos, capazes de expressar toxinas de *Bt*, potentes inseticidas considerados seguros para o meio ambiente (ANDREWS *et al.*, 1987). Atualmente, dispõe-se de dezenas de plantas transgênicas carregando genes codificadores de proteínas Cry como tabaco, batata, algodão, milho e soja (JOUANIN *et al.*, 1998; MOHAN-BABU *et al.*, 2003), entre muitos outros, mas apenas algumas delas são comercializadas.

Existem, ainda, algumas questões a serem avaliadas em relação a essa tecnologia. Há preocupações da comunidade científica com aspectos de segurança ambiental e de biossegurança das proteínas de *Bt* em mamíferos (VÁSQUEZ-PADRÓN *et al.*, 1999; 2000; BETZ *et al.*, 2000) e principalmente, a aceitação, pelo consumidor, de produtos que transgridem a “barreira-das-espécies” tem sido difícil de ser obtida. Além disso, o surgimento de insetos resistentes vem sendo relatado (McGAUGHEY & WHALON, 1992; TABASHNIK, 1994) e a existência de insetos não suscetíveis a qualquer toxina de *Bt* conhecidas, principalmente trips, mirídeos, afídios e ácaros (LUTTERELL *et al.*, 1994) despertam o interesse em estudar outras proteínas inseticidas, que possam ser usadas individualmente no controle de insetos-praga ou em associação com outras proteínas já descritas.

Exposto isso, surge a necessidade de desenvolver novos mecanismos para driblar a capacidade adaptativa dos insetos, como a descoberta de novas toxinas inseticidas e a introdução de múltiplos genes na mesma planta. Para tal, é preciso conhecer a proteína a ser introduzida, seu papel fisiológico e modo de ação, etapas imprescindíveis nesse processo.

### **1.1. Co-evolução inseto - planta**

Devido à presença de diversos compostos protetores, as plantas apresentam a capacidade de resistir ao ataque de fitófagos. Entretanto, alguns insetos-praga são capazes de superar as barreiras de defesas das plantas, sendo capazes de se alimentar, crescer e se reproduzir na planta (MELLO & SILVA-FILHO, 2002). Em geral, apenas um número limitado, destes insetos, são hábeis em se alimentar de cada espécie vegetal.

Além disso, há evidências de que o sistema de defesa de alguns vegetais pode diminuir, devido à domesticação. Algumas linhagens selvagens de plantas possuem naturalmente altos níveis destes compostos e quando domesticados perderam ou reduziram a capacidade de sintetizar moléculas de defesa (HILDER *et al.*, 1987).

Por outro lado, a produção e o acúmulo de toxinas pelas plantas podem ser seguidos por uma resposta do predador, tal como a detoxificação ou a excreção da toxina, capacitando-o a utilizar a planta alvo como alimento. Desta maneira a adaptação da planta é seguida por uma contra-adaptação do predador levando ao aparecimento de linhagens de insetos resistentes aos compostos de defesa presentes na planta.

### **1.2. Sementes e os danos causados por fungos**

Os organismos mais importantes que infectam as sementes são os fungos, responsáveis não só pela disseminação de doenças mas, também, pelo apodrecimento das sementes no solo, pela deterioração durante o armazenamento e pela produção de micotoxinas. Em condições climáticas

normais, se as sementes forem colhidas na maturidade normal, a infecção fúngica será mínima. Com o atraso da colheita, em condições de alta umidade, quer em forma de chuva ou em forma de orvalho, a quantidade de sementes infectadas aumenta muito e rapidamente (WILCOX *et al.*, 1974; DHINGRA *et al.*, 1978). Os fungos mais prejudiciais à produção de sementes de soja nas condições brasileiras são *Phomopsis* sp e *Fusarium* sp (principalmente *F. semitectum*), ambos responsáveis pela podridão das sementes após o plantio (DHINGRA & ACUÑA, 1997).

Considerável interesse tem sido dedicado às propriedades biopesticidas das enzimas quitinolíticas, devido à capacidade destas de atuarem como agentes de defesa contra organismos quitinosos como fungos e insetos. A resistência conferida pelas quitinases em plantas expressando estas enzimas é explicada por danos causados a estruturas vitais destes organismos como a membrana peritrófica ou a cutícula de insetos, e a parede celular de fungos patogênicos ou, ainda, por meio da liberação de compostos derivados destas estruturas e que podem estimular mecanismos de defesa presentes no próprio vegetal. Outra grande vantagem da utilização destas enzimas é o fato de que a quitina está ausente em plantas, o que garante a especificidade contra organismos invasores ou predadores. Além disto, alguns trabalhos relatam a resistência de plantas expressando quitinases contra um amplo espectro de patógenos (Tabela 1).

Os genes codificadores de quitinases utilizados nos trabalhos de engenharia genética têm origens bastante diversificadas como outras plantas, insetos e fungos filamentosos.



Tabela 1. Exemplos de plantas transgênicas expressando genes codificadores de quitinases e a resistência das mesmas a diferentes fungos fitopatogênicos ou a insetos.

Planta	Transgenes(s)	Patógeno(s) e Inseto(s)	Referência
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco, fumo)	<i>rch1</i> (quitinase de arroz)	<i>Cercospora nicotianae</i>	ZHU <i>et al.</i> , 1994
<i>Brassica napus</i> (canola)	Gene quimérico de duas endoquitinases (tabaco + tomate)	<i>Cylindrosporium concentricum</i> <i>Phoma lingam</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	GRISON <i>et al.</i> , 1996
<i>N. tabacum</i>	cDNA de uma quitinase de <i>Manduca sexta</i> (cigarrinha da cana-de-açúcar)	<i>Oryzaephilus mercator</i> (besouro-dos-grãos-do-mercador)	WANG <i>et al.</i> , 1999
<i>N. tabacum</i>	<i>chi1</i> do fungo <i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	TERAKAWA <i>et al.</i> , 1997
<i>N. tabacum</i>	cDNA de uma quitinase de <i>M. sexta</i>	<i>M. sexta</i> e <i>Helionthis virescens</i>	DING <i>et al.</i> , 1998
<i>Solanum tuberosum</i> (batata)	<i>chit42</i> (quitinase do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> )	<i>Alternaria solani</i>	LORITO <i>et al.</i> , 1998
<i>N. tabacum</i>	<i>chit42</i> e <i>ThEn-42</i> (quitinases do fungo <i>T. harzianum</i> )	<i>Alternaria alternata</i> <i>B. cinerea</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	LORITO <i>et al.</i> , 1998

<i>Dendranthema grandiflorum</i> (crisântemo)	<i>rcc2</i> (quitinase de arroz)	<i>B. cinerea</i>	TAKATSU <i>et al.</i> , 1999
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	<i>pccht28</i> (endoquitinase de <i>L. chilense</i> )	<i>Verticillium dahliae</i>	TABAEIZADEH <i>et al.</i> , 1999
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	<i>rc-7</i> (PR-3 de arroz)	<i>R. solani</i>	DATTA <i>et al.</i> , 2001
<i>Malus x domestica</i> (maçã)	Endoquitinase <i>ech42</i> e exoquitinase <i>nag70</i> de <i>T. harzianum</i>	<i>Venturia inaequalis</i>	BOLAR <i>et al.</i> , 2001
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Quitinase de cevada (PR)	<i>Erysiphe graminis f. sp. tritici</i> e <i>Puccinia recondita f. sp. tritici</i>	OLDACH <i>et al.</i> , 2001
<i>Brassica oleracea var italica</i> (brócolis)	<i>chit42</i> (quitinase de fungo <i>T. harzianum</i> )	<i>Alternaria brassicicola</i>	MORA & EARLE, 2001
<i>Arachis hypogaea</i> (amendoim)	<i>chi</i> (PR de tabaco)	<i>Cercospora arachidicola</i>	ROHINI & RAO, 2001
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	<i>rcc2</i> (quitinase de arroz)	<i>B. cinerea</i>	KISHIMOTO <i>et al.</i> , 2002
<i>Agrostis palustris</i> (grama)	<i>hs2</i> (quitinase de <i>Ulmus americana</i> , uma arbórea)	<i>R. solani</i>	CHAI <i>et al.</i> , 2002
<i>N. tabacum</i>	<i>chit42</i> (quitinase de fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> )	<i>R. solani</i>	KERN, 2003

### 1.3. Sementes de leguminosas como fonte de proteínas

As sementes de leguminosas são uma importante fonte de proteínas, as quais podem corresponder a 40% do peso seco da semente. Se comparadas com

os cereais, as leguminosas podem ter teores 2 a 3 vezes mais elevados de proteínas. O crescente uso dessas sementes na alimentação humana e animal é justificado pela alta produtividade agrícola, pelo baixo custo de produção e pelo alto valor nutritivo.

As leguminosas são também fontes importantes de carboidratos, apresentando baixos teores de lipídeos, na sua maioria, insaturados. Possuem, ainda, quantidades razoáveis de tiamina e ácido ascórbico, bem como minerais importantes, como cálcio e ferro. A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) conta com cerca de 40% do seu peso seco em proteínas (BRESSANI & ELIAS, 1980).

### **1.3.2. A soja, uma semente de leguminosa importante**

A soja vem sendo utilizada como alimento desde épocas bastante remotas, com as primeiras referências datadas em 3000 a.C. em uma obra médica de Shen-Non. Até o século XV seu consumo ficou restrito à China, quando então se expandiu para o Japão, Indonésia, Filipinas, Tailândia, Nepal e norte da Índia. Em 1739 ocorreu seu plantio na Europa, no Jardim Botânico de Paris e, em 1765, foi introduzida nos Estados Unidos por Samuel Bowen (COSTA, 1996).

No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia, em 1882, por Gustavo D'Utra. Da Bahia foi levada para São Paulo e, em 1900, foi cultivada pela primeira vez no Rio Grande do Sul, em Dom Pedrito, pelo Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Albert Welhauser. Entre os anos de 1961-65, o Rio Grande do Sul foi responsável por 90% da produção brasileira de soja (COSTA, 1996). Hoje, o Rio Grande do Sul contribui com 18,6%, o Paraná com 18,5% e o Mato Grosso com 24,2% da produção brasileira de soja, que chegou a um total de 21.275 milhões de toneladas na última safra (CONAB, dez

2004). Os dados da safra 2003/2004 colocam os Estados Unidos como o maior produtor mundial da leguminosa, com uma contribuição de 35%, tendo no mesmo período o Brasil contribuído com 27%, a Argentina com 18% e a China com 8,7% da produção mundial de soja. Segundo estimativas do Ministério da Agricultura, a colheita de soja no Brasil será de aproximadamente 22,3 milhões de toneladas na safra 2004/05 (CONAB, dez 2004).

#### **1.4. Proteínas tóxicas em sementes.**

Em função das sementes representarem uma forma de perpetuação de suas espécies, as mesmas podem conter, com frequência, proteínas tóxicas e/ou fatores antinutricionais para insetos e animais que venham a consumi-las. Se considerarmos somente as substâncias de natureza proteica que são encontradas em sementes, as lectinas, os inibidores de proteinases e de glicoidrolases (BOWLES, 1990, RYAN, 1989, 1990, CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991, PEUMANS & VAN DAMME, 1995) as quitinases (HERGET *et al.*, 1990) e as vicilinas modificadas (MACEDO *et al.*, 1993) são as mais conhecidas. Ao consumir sementes de alto conteúdo proteico, como são as leguminosas (MARTIN, 1984), os animais e o homem estão constantemente expostos a tais substâncias defensivas. Algumas dessas proteínas apresentam certa termoestabilidade e persistem ativas mesmo após o cozimento (CARLINI & UDEDIBIE, 1997).

##### **1.4.1. Inibidores de enzimas hidrolíticas**

A proteólise é um processo bioquímico vital em todos os organismos vivos e seu controle intra e extracelular é um aspecto central do metabolismo. Em plantas,

além de estarem envolvidas em diversos processos metabólicos, as enzimas hidrolíticas, participam das reações de defesa contra agressões de patógenos e herbívoros (RYAN, 1989, 1990; KOIWA *et al.*, 1997). Os inibidores de proteinases de natureza proteica são geralmente classificados de acordo com a classe de proteinases sobre as quais atuam. Estas são serino-, cisteíno-, aspártico-, ou metalo-proteinases, conforme o grupo químico presente no sítio ativo, responsável pela atividade enzimática (RYAN, 1989, 1990; KOIWA *et al.*, 1997).

Tecidos vegetais, em particular as sementes, são fontes de inibidores de serino-proteinases e cisteíno-proteinases. Inibidores de metalo-proteinases e aspártico-proteinases também já foram descritos em plantas, mas em menor abundância. Alguns inibidores vegetais de serino-proteinases são moléculas bifuncionais, possuindo atividade anti-trípica e de inibidores de  $\alpha$ -amilases, associados a dois domínios proteicos distintos (RYAN, 1990).

Os insetos utilizam em suas funções digestivas uma combinação de serino-, cisteíno-, e/ou aspártico-proteinases (TERRA & FERREIRA, 1994). Inibidores destas enzimas são produzidos pelos vegetais e podem afetar o desenvolvimento de fitopatógenos e herbívoros, retardando a proteólise nestes organismos. Evidências indicam o envolvimento de inibidores de serino- e cisteíno-proteinases nos mecanismos de defesa das plantas contra herbívoros, como a indução química e/ou ambiental e dos padrões de expressão tecido-específico e temporal de seus genes (BOTELLA *et al.*, 1996; KOIWA *et al.*, 1997).

Os inibidores de tripsina em vegetais podem pertencer a duas classes: os do tipo Bowman-Birk e os do tipo Kunitz. Variantes destes dois tipos de inibidores

têm sido isolados e caracterizados, e demonstraram possuir poucas diferenças quanto as seqüências de aminoácidos, à mobilidade eletroforética e à especificidade (LIENER, 1994).

O inibidor do tipo Bowman-Birk possui massa molecular relativamente baixa (7 a 10 kDa), cadeia polipeptídica composta de 71 resíduos de aminoácidos, sítios de ligação separados e independentes para tripsina (Lys 16 e Ser 17) e quimotripsina (Leu 43 e Ser 44), um alto conteúdo de serina e cisteína, formando muitas ligações dissulfeto intracadeias (7 – 9), o que lhe confere uma estrutura tridimensional bastante compacta, como revelado por cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear, sendo, também resistente à desnaturação térmica e química (CHEN *et al.*, 1992; WERNER *et al.*, 1992).

O inibidor do tipo Kunitz apresenta massa molecular em torno de 20 kDa com 181 resíduos de aminoácidos, forte reação inibidora sobre a tripsina (Arg 63 e Ile 64) e fraca em relação à quimotripsina, baixo número de ligações dissulfeto e maior susceptibilidade à inativação pelo calor e condições ácidas. Esta molécula combina-se com tripsina de forma estequiométrica, ou seja, uma molécula do inibidor inativa uma molécula de tripsina. O complexo formado é análogo a um complexo enzima-substrato, mas que não se dissocia em uma extensão apreciável, pois a ligação entre a enzima e o inibidor é muito forte (LIENER, 1994). Estes inibidores, quando presentes nas dietas para ratos, retardam o crescimento do animal ( $\pm 40\%$ ), diminuem a digestibilidade das proteínas presentes na dieta, reduzem a absorção de nitrogênio e enxofre, causam hipertrofia e hiperplasia

pancreática e aumentam a síntese e liberação de fatores hormonais (GRANT, 1989; GRANT *et al.*, 1989, 1995; NORTON, 1991).

Seqüências de DNA codificando diferentes inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas foram incorporados ao genoma de diferentes plantas como cereais, tabaco e batata. Efeitos protetores vêm sendo obtidos em alguns casos, principalmente contra pestes como fitonematóides, coleópteros e lepidópteros (LEPLE *et al.*, 1995; URWIN *et al.*, 1995; KOIWA *et al.*, 1997; SCHULER *et al.*, 1998; LECARDONNEL *et al.*, 1999; USSFUL *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação dos inibidores de proteinases está relacionado com o processo digestivo dos insetos. Por meio de sua ligação específica a enzimas proteolíticas do intestino, impedem que estas executem suas funções primordiais no processo de digestão protéica, ocorrendo uma diminuição da assimilação de nutrientes (RYAN, 1991). Quando insetos são submetidos a uma dieta artificial contendo inibidores, estes têm seu desenvolvimento retardado, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significantes (McMANUS & BURGESS, 1995).

A real aplicabilidade de inibidores de proteinases na proteção da planta deve ser cuidadosamente estabelecida. Durante a evolução, fitófagos estiveram em contato com uma ampla variedade destas proteínas, produzidas naturalmente pelas plantas e conseqüentemente desenvolveram estratégias para contornar seus efeitos (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). A habilidade de algumas espécies em compensar a inibição através da expressão de enzimas proteolíticas secundárias ou super-expressar a atividade enzimática das mesmas pode limitar a aplicabilidade de inibidores de proteases contra algumas espécies (PAULILLO *et*

*al.*, 2000; BRITTO *et al.*, 2001). Um bom exemplo é o bruquídeo *Callosobruchus maculatus*, que, sob dieta contendo o inibidor de cisteíno-protease de soja, soyacistatina N, apresentou aumento da expressão de proteases digestivas, expressando outras proteases não suscetíveis à inibição ou capazes de clivar o inibidor. Porém, estes processos adaptativos só ocorreram quando baixas doses de inibidor foram administrados. Desta forma, altas doses são necessárias para suprimir a resistência dos insetos (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003).

Outro aspecto importante a ser observado é o efeito deletério destas proteínas quando consumidas por mamíferos e aves. Os inibidores de proteinases de soja, por exemplo, causam inibição do crescimento em ratos (KLOSE *et al.*, 1946; ARMOUR *et al.*, 1998), galinhas (HAM, *et al.*, 1945) e camundongos (WESTFALL & HAUGE, 1948), um efeito geralmente acompanhado de diminuição da digestibilidade de proteínas da dieta (GRANT, 1989; LIENER, 1994; ARMOUR *et al.*, 1998), hiperplasia e hipertrofia pancreática, contribuindo, assim, para uma diminuição significativa da qualidade proteica das sementes (GRANT *et al.*, 1989; NORTON, 1991).

#### **1.4.2. Lectinas**

As lectinas são proteínas de origem não-imune, com capacidade de interação seletiva com resíduos de carboidratos, sem, no entanto, modificá-los, excluindo desta definição imunoglobulinas e enzimas (LIENER *et al.*, 1986; PEUMANS & VAN DAMME, 1995). PEUMANS & VAN DAMME, em 1995, redefiniram o conceito de lectinas como sendo qualquer proteína que possua pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se, reversivelmente, a mono ou



oligossacarídeos. A partir de então, as lectinas foram divididas em três classes: (a) as hololectinas, que possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, compreendendo a maioria das lectinas vegetais; (b) as merolectinas, que possuem um único sítio de ligação a carboidratos e, (c) as quimerolectinas, que contêm um ou mais domínios de ligação a carboidratos e, mais um domínio com atividade catalítica que possui atividade independente, como, por exemplo, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs tipo 2) e as quitinases (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; 1996). Sendo multivalentes, as hololectinas são capazes de aglutinar células, sendo esta uma das muitas atividades biológicas destas proteínas, que estão presentes em muitas espécies vegetais (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

A propriedade de interação seletiva das lectinas com glicoconjugados é, hoje em dia, a base de várias aplicações biotecnológicas de lectinas como insumos laboratoriais de alto valor agregado, para usos analíticos e preparativos como procedimentos de separação, tipagem e caracterização de diferentes tipos de macromoléculas, células e microrganismos (KOCOUREK & FREED, 1990; VAN DRIESSCHE *et al.*, 1996). As lectinas também são utilizadas em estudos da função imunológica, da asma e do processo inflamatório, entre outros, e para a indução da proliferação linfocitária e de produção de interferon, inclusive, com aplicações clínicas (KOCOUREK & FREED, 1990; VAN DRIESSCHE *et al.*, 1996).

Sabe-se que muitas lectinas podem interferir no metabolismo de animais e do homem (GRANT, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1988). Algumas lectinas, ao contrário de outras proteínas, são resistentes à hidrólise enzimática no trato intestinal, sendo recuperadas intactas e, ainda biologicamente ativas nas fezes dos animais

(PUSZTAI *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1994). Sobrevivendo à ação das enzimas do trato gastrintestinal, estas lectinas podem reagir com as células epiteliais do intestino, e de modo cumulativo, trazem complicações a quem as consome. A lectina presente em sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) liga-se, *in vivo*, às microvilosidades do duodeno e do jejuno de ratos; parte dela é posteriormente endocitada, sendo detectada intacta no sistema circulatório de animais (KING *et al.*, 1986). A baixa performance, no desenvolvimento, observada em ratos alimentados com feijão deve ser devido à habilidade das lectinas ligarem a receptores específicos do epitélio intestinal, e essa interação interfere na absorção e na utilização dos nutrientes da dieta (JAFFÉ, 1960).

As funções fisiológicas propostas para as lectinas vegetais incluem o transporte e o armazenamento de hormônios vegetais que ligam regiões hidrofóbicas destas moléculas (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983), a participação na colonização e na nodulação das raízes de leguminosas por bactérias *Rhizobium* (HIRSCH, 1999), e um papel nos mecanismos de defesa da planta contra fitopatógenos e a herbivoria de insetos fitófagos (CHRISPEELS & RAIKEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995; GATEHOUSE *et al.*, 1995).

Genes codificando lectinas entomotóxicas têm sido introduzidos em diferentes espécies vegetais, produzindo plantas transgênicas menos suscetíveis ao ataque de insetos (PEFEROEN, 1987; SCHULER *et al.*, 1998; JOUANIN *et al.*, 1998; HILDER & BOULTER, 1999; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). O mecanismo de ação, proposto contra insetos, envolve a ligação específica da lectina a glicoconjugados da parede intestinal do inseto, podendo ocorrer muitas outras interações (GATEHOUSE *et al.*, 1995).

Assim, uma das aplicações em estudo para as lectinas vegetais é a construção de plantas transgênicas que expressam essas proteínas como bioinseticidas. O efeito deletério de várias lectinas para insetos das ordens *Coleoptera* (besouros), *Homoptera* (pulgões e afídeos) e *Lepidoptera* (borboletas e mariposas) está amplamente documentado (GATEHOUSE, 1994; SCHULER *et al.*, 1998). Dietas artificiais para o inseto *C. maculatus* contendo as lectinas de *O. sativa* (arroz) e de *Urtica dioica* retardaram o desenvolvimento das larvas e, dependendo da dose, causaram morte (HUESING *et al.*, 1991). Além das lectinas clássicas, outras proteínas de sementes estruturalmente relacionadas, como a arcelina, presente em linhagens selvagens do feijão comum *P. vulgaris* (OSBORN *et al.*, 1988), inibem o crescimento de fungos e de insetos (GERHARDT *et al.*, 1999).

A lectina da soja (SBA), é uma glicoproteína tetramérica composta de duas subunidades diferentes, ambas com alanina como seu resíduo N-terminal. Quando comparada com outras lectinas, a SBA é rica em aminoácidos básicos e ácidos, sendo destituída de cisteína. A lectina da soja possui afinidade por N-acetil-D-galactosamina e, quando incorporada a dietas para ratos, liga-se às células do epitélio do intestino delgado, produzindo mudanças nas suas funções e morfologia. Quantidades significativas dessa proteína sobrevivem à passagem pelo sistema digestivo, sendo recuperada nas fezes (40 – 50%), em uma forma imunorreativa e biologicamente ativa, ainda com capacidade hemaglutinante (PUSZTAI & BARDOCZ, 1995).

Desta forma, a aplicabilidade de lectinas entomotóxicas para a construção de plantas resistentes a insetos é largamente restringida por sua toxicidade em

mamíferos e/ou insetos não-alvo, causando um efeito tritrófico na fauna, atingindo insetos predatórios que se alimentam dos insetos-praga intoxicados (BIRCK *et al.*, 1999; DOWN *et al.*, 2000; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

### **1.4.3. Inibidores de $\alpha$ -amilases.**

As  $\alpha$ -amilases (alfa-1,4-glicanoidrolases), enzimas abundantes encontradas em animais, plantas e microrganismos, catalisam a hidrólise inicial de polissacarídeos com ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, como amido e glicogênio, produzindo oligossacarídeos menores que serão posteriormente transformados em carboidratos simples assimiláveis pelos organismos. Em insetos que se alimentam de sementes durante sua fase adulta e/ou larval, essas são as enzimas digestivas mais importantes (GROSSI-DE-SÁ & CHRISPEELS, 1997; STROBL *et al.*, 1998).

Inibidores de  $\alpha$ -amilases ocorrem em muitas plantas, como em cereais e leguminosas. Os inibidores presentes no feijão comum *P. vulgaris* mostram efeito entomocida em vários insetos-praga (HUESING *et al.*, 1991; ISHIMOTO *et al.*, 1996; GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 1997). Em plantas transgênicas expressando esses inibidores, observou-se a diminuição da infestação de sementes por bruquídeos como o caruncho-da-ervilha (*Bruchus pisorum*), o caruncho-do-feijão-de-corda (*C. maculatus*) e o do feijão Azuki (*C. chinensis*) (SHADE *et al.*, 1994; SCHROEDER *et al.*, 1995; ISHIMOTO *et al.*, 1996; MORTON *et al.*, 2000).

### 1.5. As ureases.

As ureases (uréia amidoidrolase, EC 3.5.1.5) são metalo-enzimas dependentes de níquel (DIXON *et al.*, 1975) que catalisam a reação de hidrólise da uréia à amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente para formar dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia (WANG *et al.*, 1955; Figura 1). Foi a primeira proteína a ser isolada e cristalizada, em 1926 por SUMNER, a partir das sementes de *Canavalia ensiformis*. A urease é uma proteína comum em sementes de leguminosas, (MILTON, *et al.*, 1969 e STAPLES, *et al.*, 1976).

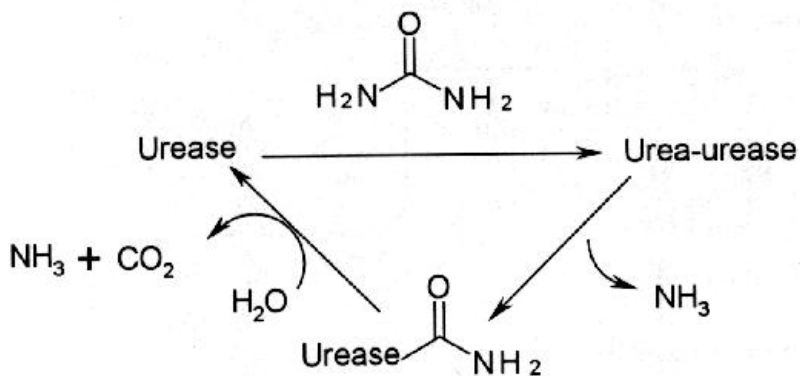


Figura 1: Reação de hidrólise da uréia, catalisada pela urease.

As ureases são amplamente distribuídas, sendo encontradas em bactérias e fungos, além de plantas. As ureases bacterianas são formadas por duas ou três cadeias polipeptídicas distintas, UreA e UreB em *Helicobacter pylori* e UreA, UreB e UreC em outras bactérias, como *Klebsiella aerogenes* (Figura 2). Cada subunidade das ureases bacterianas corresponde a um domínio altamente conservado, inclusive nas ureases vegetais e fúngicas. O domínio  $\alpha$  corresponde

à subunidade UreC, o domínio  $\beta$  corresponde à UreB e o domínio  $\gamma$  à UreA (SIRKO & BRODZIK, 2000). Em *H. pylori*, os domínios  $\beta\gamma$  estão unidos na cadeia ou subunidade UreA, e o domínio  $\alpha$  corresponde à subunidade UreB (SIRKO & BRODZIK, 2000).

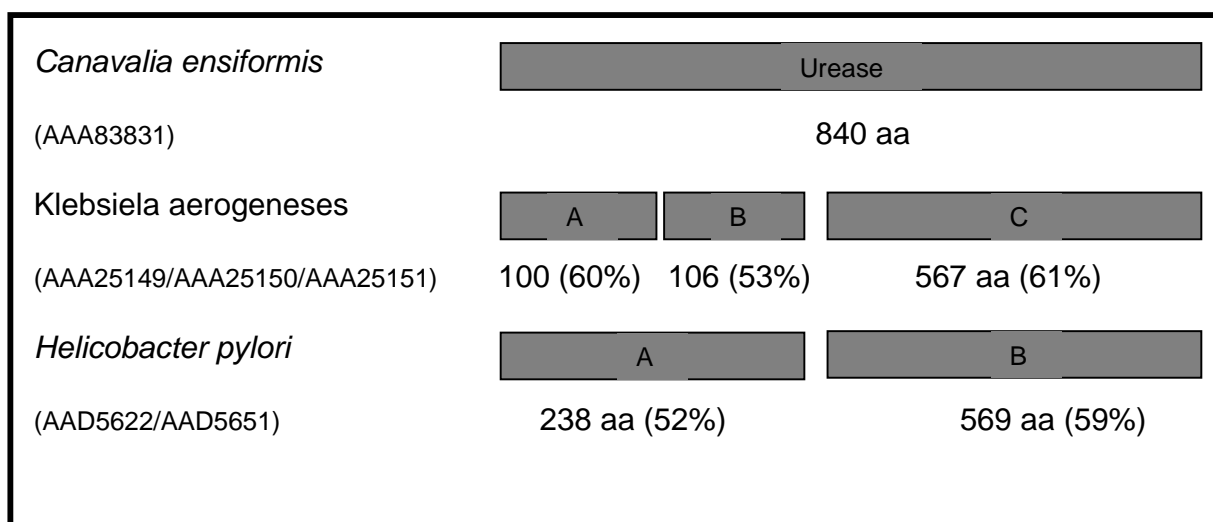


Figura 2: Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de diferentes organismos. O número de acesso às seqüências no GenBank está indicado abaixo do nome do organismo, o número de aminoácidos e os valores em percentual representados abaixo de cada bloco indicam o grau de identidade com a urease de *C. ensiformis* (Adaptado de SIRKO & BRODZIK, 2000).

As ureases microbianas são enzimas importantes em alguns estados patológicos humanos ou de animais, no metabolismo de ruminantes e nas transformações ambientais de certos componentes nitrogenados (MOBLEY & HAUSINGER, 1989). No caso dos ruminantes, as ureases bacterianas desempenham uma função importante no metabolismo animal. Quantidades consideráveis de uréia proveniente do animal são recicladas no rúmen originando

amônia que, por sua vez, é a maior fonte de nitrogênio para muitas bactérias que aí habitam (BRYANT, 1959). A biomassa microbiana gerada é, então, utilizada como nutriente pelo ruminante.

As ureases bacterianas estão envolvidas na patogênese de muitas condições clínicas como a ulceração péptica e a formação de cálculos urinários, contribuindo para a patogênese de pielonefrites, encefalopatia causada por amônia, coma hepático, e incrustação de cateter urinário (MOBLEY & HAUSINGER, 1989).

Apesar da abundância de urease em alguns tecidos e principalmente em sementes, pouco se sabe sobre sua função no vegetal. Acredita-se que a urease não desempenhe uma função vital, pois a uréia, que é seu principal substrato, não é um metabólito importante em plantas. A uréia é uma forma de excreção de nitrogênio em animais e não em plantas (POLACCO, *et al.*, 1993). Ainda assim, postula-se que a principal função das ureases de plantas esteja relacionada à reciclagem de nitrogênio a partir da uréia. Durante a germinação, a uréia endógena é, na sua maioria, produto da degradação de arginina, que é ativamente degradada em uréia e ornitina (GOLDRAIJ & POLACCO, 1999). A urease catalisa a conversão de uréia à amônia permitindo que essa seja assimilada na via de síntese de glutamina (LAM *et al.*, 1996). A uréia aplicada como fertilizante é reciclada em plantas por meio da urease (WITTE *et al.*, 2002).

Estudos revelaram, que a urease pode ser a relação nutricional entre plantas e bactérias comensais que estão a elas associadas. Sob algumas condições, estas bactérias possuem uma contribuição significativa para o perfil de urease da planta e, a planta (especificamente a soja), em retorno, parece

providenciar níquel ativado, essencial para a síntese da urease bacteriana ativa (POLACCO *et al.*, 1993).

### **1.5.1. Ureases na semente do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)**

A semente do feijão-de-porco (*C. ensiformis*), uma leguminosa com alta resistência a insetos, possui várias proteínas importantes: a urease (SUMNER, 1926), a lectina concanavalina A (SUMNER e HOWELL, 1936), inibidores de tripsina (UBATUBA, 1955) e a canatoxina (CNTX; CARLINI & GUIMARÃES, 1981).

A urease de *C. ensiformis* foi a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER, 1926). Sua unidade estrutural básica constitui-se de uma cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos e massa molecular de 90,77 kDa. A forma mínima da enzima ativa é trimérica, com 270 kDa, sendo encontrada na forma nativa como um hexâmero de 540 kDa (ZERNER, 1991). Possui dois átomos de níquel no sítio ativo, cada um coordenado por dois resíduos de histidina (JABRI *et al.*, 1995).

Em 1981, CARLINI & GUIMARÃES isolaram, das sementes de *C. ensiformis*, uma proteína neurotóxica a qual denominaram canatoxina ou CNTX, e que posteriormente foi caracterizada como uma isoforma de urease (FOLLMER *et al.*, 2001). Esta toxina protéica, aplicada intraperitonealmente, provocou convulsão e morte em camundongos e ratos ( $DL_{50} = 0,5 - 2,0$  mg/kg; CARLINI *et al.*, 1984), mas não produz efeitos letais por via oral, provavelmente devido à sua instabilidade em meio ácido (CARLINI e GUIMARÃES, 1991). Estruturalmente, a CNTX nativa é um dímero de cadeias polipeptídicas de 95 kDa, ligadas não



covalentemente, apresentando um alto grau de homologia (85%) com a urease da mesma semente, mas apenas 30 - 40% da sua atividade enzimática sobre uréia (FOLLMER *et al.*, 2001). Esta proteína é uma metaloenzima contendo um átomo de zinco e um de níquel em cada subunidade (FOLLMER *et al.*, 2001).

Estudos sobre o mecanismo de ação da CNTX mostraram que a proteína apresenta potente efeito secretagogo em vários tipos de células de mamíferos, envolvendo eicosanóides e as vias das lipoxigenases, bem como alterações dos fluxos intracelulares de cálcio (CARLINI *et al.*, 1985; BARJA-FIDALGO *et al.*, 1991; GHAZALEH *et al.*, 1997).

Estudos adicionais mostraram que as atividades biológicas descritas para a CNTX são independentes da atividade ureásica da molécula, uma vez que, a enzima tratada com o inibidor irreversível de urease, *p*-hidroximercuriobenzoato, perde totalmente a atividade ureásica, mas mantém inalterada a sua atividade tóxica em camundongos, induzindo a agregação plaquetária e a hemaglutinação indireta, (FOLLMER *et al.*, 2001).

A urease clássica possui as mesmas atividades biológicas descritas para a CNTX, como ativação plaquetária e interação com gangliosídeos, mas não é letal por via intraperitoneal em camundongos. As atividades citadas também são independentes da atividade ureolítica (FOLLMER *et al.*, 2001). Este dado indica a existência, nestas proteínas, de pelo menos dois domínios protéicos distintos, responsáveis por atividades biológicas diferentes: um domínio com atividade hidrolítica sobre a uréia, suscetível de inibição por agentes oxidantes; e pelo menos mais um segundo domínio, níquel-e tiol-independente, responsável pela

toxicidade intraperitoneal da CNTX e outras propriedades farmacológicas compartilhadas com a urease (FOLLMER *et al.*, 2001).

Na semente, tanto a CNTX quanto a urease clássica estão localizadas no citosol das células do parênquima, bem como apresentam um padrão similar de acúmulo durante o período de maturação (SEHGAL & NAYLOR, 1966; BARCELLOS *et al.*, 1993). PIRES-ALVES *et al.*, em 2003, observaram que o ácido abscísico é capaz de induzir a expressão de uma família de genes de ureases em plântulas e folhas de *C. ensiformis*. O ácido abscísico é um fitohormônio envolvido na regulação de alguns processos essenciais nos estágios de desenvolvimento após a formação do embrião, tais como: a indução de dormência da semente, a tolerância à dissecação, o acúmulo de reservas na semente e, também, em resposta a ferimentos por dano mecânico (FOSKET, 1994). Dados como esses levam a crer que proteínas tipo CNTX/urease desempenham um importante papel fisiológico nas leguminosas, provavelmente relacionado com mecanismos de defesa da planta. Reforçam esta hipótese o efeito inseticida observado para a CNTX e para a urease em certos grupos de insetos (CARLINI *et al.*, 1997; FOLLMER *et al.*, 2004) e, também, suas propriedades de inibir o crescimento de hifas de fungos fitopatogênicos (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

### **1.5.2. Presença de Ureases em sementes de soja**

A soja possui duas isoenzimas de urease, uma embrião-específica e outra ubíqua, ambas altamente homólogas entre si e também à urease de *C. ensiformis* (KERR *et al.*, 1983; TORISKI *et al.*, 1994). A urease ubíqua, com baixa atividade específica ( $10^{-3}$  mol/min.mg) é sintetizada em todos os órgãos, mas parece ser

mais ativa em tecidos jovens. A urease embrião-específica, com maior atividade específica (1 mol/min.mg) é sintetizada exclusivamente em embriões em desenvolvimento. Entretanto, as raízes de plantas jovens de soja retêm um considerável nível da urease embrião-específica derivada do eixo embrionário bem como dos cotilédones da semente madura (HOLLAND *et al.*, 1987; POLACCO & WINKLER, 1984; POLACCO *et al.*, 1985; TORISKY & POLACCO, 1990). Cada isoenzima de urease parece ser codificada por um único gene estrutural: *Eu1* e *Eu4* para as ureases embrião-específica e ubíqua, respectivamente. Mutações em cada um dos genes afetam somente uma isoenzima (MEYER-BOTHLING & POLACCO, 1987; POLACCO *et al.*, 1989). As plantas mutantes com silenciamento da urease ubíqua apresentaram anormalidades como necroses nas extremidades das folhas e raízes, acúmulo de uréia nas folhas e sementes, e retardamento na germinação (POLACCO & HOLLAND, 1993). Já a perda da urease embrião-específica não acarretou danos visíveis à planta, sugerindo que esta enzima não possua função fisiológica importante no metabolismo de nitrogênio da planta. Muito embora a maior parte da uréia seja gerada durante a germinação (POLACCO & HOLLAND, 1993) e a maior parte da urease embrião-específica esteja presente nos cotilédones das sementes e nas raízes (TORISKY & POLACCO, 1990), a perda da urease embrião-específica não causou aumento nos níveis da uréia na semente de plantas mutantes, se comparada ao tipo selvagem, sendo esse mais um argumento de que a urease não desempenha qualquer função ligada à assimilação de uréia.

### 1.5.3. Ureases: uma nova classe de proteínas de defesa

Em 1997, a CNTX foi testada oralmente contra espécies de insetos pertencentes a diferentes ordens como: *Manduca sexta*, Lepidoptera (lagarta-do-tabaco); *Schistocerca americana*, Orthoptera (gafanhoto), *Drosophila melanogaster*, Díptera (mosca-da-fruta), *Callosobruchus maculatus*, Coleóptera (caruncho-do-feijão-de-corda), *Aedes aegypti*, Díptera (mosquito-da-febre-amarela), *Rhodnius prolixus*, Hemíptera (vetor da Doença de Chagas; CARLINI *et al.*, 1997). Observou-se, neste estudo, uma letalidade induzida pela CNTX apenas em *C. maculatus* e *R. prolixus*, cujos sistemas digestivos são baseados em enzimas proteolíticas ácidas do tipo catepsinas (TERRA *et al.*, 1988; CAMPOS *et al.*, 1989). Os demais insetos, com digestão básica baseada em enzimas tipo tripsina, não apresentaram sinais de toxicidade, mesmo após ingerirem grandes quantidades de CNTX. Verificou-se, ainda, que a CNTX ou seus peptídeos derivados não apresentam atividade inibitória das enzimas digestivas de *R. prolixus* ou atividade lectínica ou quitinolítica, sugerindo um mecanismo de ação diferente de outras proteínas inseticidas já conhecidas. Posteriormente, demonstrou-se que a administração de CNTX juntamente com inibidores de catepsinas, como pepstatina A ou E-64, aumentava o índice de sobrevivência de *R. prolixus* à ação da CNTX, indicando que esta é ativada proteoliticamente no trato digestório dos mesmos e que o(s) peptídeo(s) entomotóxico(s) resultante(s) é(são) o(s) responsável(is) pela ação inseticida (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000).

Neste mesmo estudo, foi realizada a digestão *in vitro* da CNTX com enzimas obtidas da larva de *C. maculatus*. Obteve-se, desta forma, um conjunto

de peptídeos (10 – 15 kDa) tóxicos quando injetados ou ingeridos pelos barbeiros *R. prolixus* (FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000). O peptídeo (10 kDa) mais ativo assim obtido, denominado pepcanatox, foi purificado através de processos cromatográficos clássicos (patente INPI-RS 0003334).

Com os dados da seqüência N-terminal do peptídeo, pepcanatox, (GOMBAROVITS, 1999), foram desenhados iniciadores (*primers*) para a obtenção de um fragmento codificante de um peptídeo equivalente ao produzido por hidrólise enzimática da CNTX, utilizando como molde seqüências dos genes de JBURE-II e JBURE de *C. ensiformis*. A expressão heteróloga do fragmento derivado do gene JBURE-II resultou nos peptídeos recombinantes jaburetox-2Pp (PIRES-ALVES *et al.*, 2003) e jaburetox-2Ec (MULINARI, 2004). Em concentrações de 0,01 a 0,02 % (m/m) estes peptídeos causaram 100% de mortalidade em *D. peruvianus* (STANISÇUASKI *et al.*, 2005, no prelo). O peptídeo jaburetox-2Ec também foi letal para a barata *Blattella germanica*, de digestão baseada em tripsinas, após 3 dias de ingestão de dieta contendo a 0,1% do peptídeo (MULINARI, 2004).

Estudos de FERREIRA-DASILVA, em 2002, demonstraram que o peptídeo recombinante de JBURE-II não apresentava toxicidade quando administrados por via oral ou intraperitoneal em ratos neonatos e camundongos adultos. Estudos adicionais estão em andamento para a avaliação do potencial uso de formulações deste peptídeo como bioinseticida ou a sua introdução como um transgene em plantas.

FOLLMER *et al.*, em 2004, avaliando o potencial inseticida das ureases de origem vegetal (*C. ensiformis* e *G. max*) e de origem bacteriana (*B. pasteurii*) em

*D. peruvianus* demonstraram que somente as ureases vegetais apresentam toxicidade sobre o modelo avaliado, reduzindo o ganho de massa corpórea e retardamento no desenvolvimento do estágio de ninfas para insetos adultos. Segundo os autores o fato da urease de *B. pasteurii* não apresentar atividade inseticida provavelmente foi devido à ausência parcial da seqüência correspondente ao peptídeo entomotóxico.

Para as ureases vegetais, este efeito inseticida não foi afetado mesmo após tratamento com *p*-hidroximercuribenzoato, um inibidor irreversível que age oxidando uma cisteína nas vizinhanças do sítio ativo da urease, indicando que esta propriedade é independente da atividade ureolítica da proteína (FOLLMER *et al.*, 2004). Esses resultados demonstraram a existência de múltiplos domínios proteicos com atividades biológicas diferenciadas na molécula das ureases, como proposto por FOLLMER *et al.*, em 2001. A atividade inseticida descrita para essas ureases vegetais reforça a hipótese de uma possível função de defesa dessas proteínas, como proposta por CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002.

Esta tese é composta por três capítulos, cada qual com sua seção de materiais e métodos, e resultados, seguidos de uma discussão específica. Ao final da tese é apresentada uma discussão geral e, a bibliografia completa.

Capítulo 1. **CLONAGEM DE UM GENE DE UREASE DE SOJA.**

Capítulo 2. **ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT AND BACTERIAL UREASES.** Becker-Ritt, et al., *Toxicon* 50 (2007) 971-983.

Capítulo 3. **EXPRESSION OF SOYBEAN (*Glycine max* (L) MERRIL) UBIQUITOUS UREASE IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) AND THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SOYBEAN UREASES.**

(Manuscrito submetido ao Periódico Plant and Cell Physiology)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal deste trabalho de tese consistiu em clonar os genes das isoformas de urease da soja [*Glycine max* (L) Merrill], obter a expressão heteróloga de uma das isoformas e investigar o possível papel dessas proteínas em mecanismos de defesa das plantas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar e caracterizar um fragmento do gene de urease de soja;
- Determinar o número de cópias genômicas;
- Expressar a urease ubíqua de soja em plantas transgênicas de tabaco;
- Demonstrar o efeito fungicida e/ou fungistático das ureases ubíqua e embrião-específica da soja.



## CAPÍTULO 1

### Título:

### **Clonagem de um gene de urease da soja [*Glycine max* (L) Merrill]**

Em 2001, as seqüências codificadoras completas, das ureases de soja não eram conhecidas. Iniciamos os estudos, com o objetivo de isolarmos as mesmas. Para tanto, nos utilizamos de protocolos gerais de biologia molecular. As metodologias utilizadas e resultados obtidos são descritos neste capítulo.

A discussão dos mesmos é feita ao final da tese (discussão geral), onde também são discutidos, de uma maneira mais ampla, os resultados obtidos na transformação de plantas de tabaco com o plasmídeo pGPTV-JIT contendo a seqüência codificadora da urease ubíqua de soja e, a avaliação do potencial fungicida e/ou fungistático das ureases de soja (Capítulo 2).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Protocolos gerais de biologia molecular**

Os procedimentos de quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído, assim como os protocolos de clivagem do DNA com enzimas de restrição, ligação de fragmentos a vetores plasmidiais, preparação de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , transformação genética de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico e eletroporação, (mini)preparação de DNA plasmidial, eletroforese de DNA em gel de agarose, visualização de ácidos nucleicos e preparação e preparação de meios bacteriológicos foram conduzidos essencialmente de acordo com SAMBROOK & RUSSEL (2001). Enzimas de restrição, ligação, defosforilação e síntese de DNA foram adquiridos dos fabricantes Invitrogen, Amersham Biosciences, Biolabs, Fermentas ou CENBIOT Enzimas.

#### **3.2 Material Vegetal**

Sementes de soja (*Glycine max* (L) Merril) para o cultivo de plantas e posterior extração de DNA foram obtidas da Cotricampo, Crissiumal – RS.

#### **3.3 Oligonucleotídeos sintéticos (*primers*)**

Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados nas reações em cadeia da DNA polimerase (PCR), GmUre1For e GmUre1Rev, foram definidos a partir da análise de seqüências parciais de nucleotídeos de ureases vegetais já publicadas e utilizados em experimentos de amplificação por PCR. O tamanho e a seqüência dos primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos sintéticos empregados em PCRs.

<i>Primer</i>	Tamanho	Seqüência
GmUre1For	19mer	5'-GGTGAAGATGAGGCCTATG-3'
GmUre1ver	20mer	5'-CTTAAAAGAGGAAGTAATTT-3

### 3.4 Extração de DNA genômico de *Glycine max*

Folhas de plantas de *G. max* cultivadas no solo durante aproximadamente 30 dias (~20 cm de altura) foram utilizadas para extração de DNA pela técnica CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987).

### 3.5 Amplificação de DNA por PCR

Amplificação do DNA PCR foi realizada para obtenção da seqüência parcial do gene de urease, que é amplificado entre o par de oligonucleotídeos. As reações foram realizadas em tubos de 0,5 mL em volume final de reação de 50 µL. Foram utilizados 200 ng de DNA-molde, 200 µM de desoxirribonucleotídeos (dNTPs), 200 ng de cada *primer*, 5U de Taq DNA polimerase (CENBIOT Enzimas) e 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, com a programação do termociclador apresentada na Tabela 3 .

Tabela 3. Programa de amplificação de PCR.

Etapa	Temperatura ( <sup>0</sup> C)	Tempo (minutos)
1	96	2
2	96	1
3	47	1
4	72	1,5
5	35 ciclos da etapa 2 a 4	
6	72	5
7	4	5

### 3.6 Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose

Para a purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose foi utilizado o sistema de eletroforese horizontal. Após a eletroforese, o DNA foi visualizado em transiluminador ultravioleta (UV) de comprimento de onda curto e pedaços do gel contendo o fragmento de interesse foram recortados. Procedeu-se, então, sua purificação utilizando-se o *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), seguindo-se as recomendações do fabricante.

### 3.7 Reação de ligação de DNA

As reações de ligação de DNA foram realizadas utilizando-se *SureClone<sup>TM</sup> Ligation Kit* (Amersham Biosciences), seguindo-se as recomendações do fabricante.

### **3.8 Hibridização DNA-DNA – Radioativo**

DNA total (20 µg) de *G. max* foi clivado com diferentes enzimas de restrição (5 U/µg de DNA) durante 5 h a 37° C. Os produtos das clivagens foram precipitados e aplicados em gel de agarose a 0,8%, com tempo de corrida de 4 horas. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA resolvidos foram transferidos para uma membrana de náilon (Hybond<sup>+</sup>, Amersham Biosciences) por capilaridade e fixado. As transferências por Southern *blot*, pré-hibridizações e lavagens foram realizadas essencialmente como descrito em MEMELINK et al., (1994). O fragmento de DNA utilizado como sonda foi marcado com  $\alpha$ -32<sup>P</sup>-dCTP (Amersham Biosciences) mediante uma PCR. As membranas de náilon foram expostas a filmes auto-radiográficos (Kodak), em cassetes contendo intensificador, a -70° C durante 5 dias.

### **3.9 Isolamento de gene(s) codificadores de urease(s) de *Glycine max***

Com vistas ao isolamento de gene(s) codificador(es) de urease(s) de *G. max*, o screening direto de fragmentos de DNA correspondentes às bandas de hibridização em *Southern blots* anteriormente produzidos, foi realizado por PCRs. Com o resultado obtido com a análise de hibridização de *Southern blot*, realizamos nova digestão do DNA genômico de folhas jovens de *G. max* utilizando a enzima *Xba*I. O DNA digerido foi resolvido por eletroforese em gel de agarose sob as mesmas condições utilizadas para o *Southern blot*.

### 3.10 Seqüenciamento automático de DNA

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram ligados no vetor pUC18 de clonagem SureClone™ Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os clones contendo os insertos de DNA em seus plasmídeos foram multiplicados por 18 h sob agitação (200 rpm, 37° C), em tubo contendo 1,5 mL de meio LB líquido com 100 mg/L de ampicilina. Estas culturas tiveram seus DNAs plasmidiais minipreparados e os plasmídeos purificados. O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos primers GmUre1For ou GmUre1Rev (Tabela 2) e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96° C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96° C por 10 seg, 55° C por 5 seg e 60° C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95° C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob";

BioLIMS Project “3100 Project1”; Run Module 1 “StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz”. As seqüências resultantes foram comparadas individualmente com o banco de dados do EMBL/GenBank pelo programa BLASTn (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.org](http://www.ncbi.nlm.nih.org)).

### 3.11 PCR inversa (iPCR)

Foi definido um novo par de *primers* (Tabela 4), baseados nas seqüências parciais de genes de ureases disponíveis, os quais incluem um sítio de restrição para a enzima *SaI*.

Tabela 4: Oligonucleotídeos sintéticos iPCR:

<i>Primer</i>	Tamanho	Seqüência
GmUre2For	23 mer	5'-CTGTCGACCCAGATAACTACTACT-3'
GmUre2Rev	23 mer	5'-GGGTCGACAGTGATTTGTGGAAG-3'

DNA total (20 µg) de *G. max* foi clivado com diferentes enzimas de restrição (5 U/µg de DNA): *Bam*HI, *Eco*RI, *Hinc*II, *Hind*III, *Pst*I e *Xho*I, durante 3 h a 37 °C. Após confirmação da clivagem total do DNA por eletroforese em gel de agarose, foi realizada a reação de circularização dos fragmentos produzidos utilizando-se a enzima T4 DNA ligase. A uma alíquota de 5 µL de cada reação de clivagem, adicionou-se 1 µL da enzima [1 U/µL], tampão de ligação para uma concentração final de 1X. A reação foi incubada a 16 °C “overnight”. Uma alíquota de cada uma

das etapas foi utilizada em PCRs. As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volume final de reação de 50  $\mu$ L. Foram utilizados 200 ng de DNA-molde, 200  $\mu$ M de dNTPs, 200 ng de cada *primer*, 5 U de Taq DNA polimerase (CENBIOT Enzimas) e 3 mM de  $MgCl_2$ . Foram testadas várias condições de temperatura e tempo de extensão. A programação do termociclador, na qual obtivemos os melhores resultados, está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Programa de amplificação para iPCR.

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tempo (minutos)
1	96	2
2	96	1
3	50	1
4	72	4
5	30 ciclos da etapa 2 a 4	
6	72	5
7	4	5



#### 4. RESULTADOS

A estratégia utilizada para o isolamento de seqüências dos genes de urease foi a amplificação direta das mesmas por meio de PCRs utilizando DNA genômico de *G. max* com molde. A partir de regiões conservadas das seqüências de genes de urease disponíveis no GenBank, dois oligonucleotídeos correspondentes a uma região central altamente conservada foram definidos para a confecção de *primers* a serem utilizados nas PCRs.

Fragmentos de aproximadamente 300 e 600 pb resultaram da amplificação de DNA de soja nas reações (Figura 4).

Os fragmento de DNA amplificados foram purificados do gel de agarose e utilizados em uma nova PCR para a obtenção de maior quantidade, a fim de confirmação do produto esperado pelo seqüenciamento e para a clonagem em pUC18.

Os fragmentos de DNA amplificados foram clonados utilizando-se o vetor plasmidial pUC18. A clonagem do fragmento foi confirmada em ensaios de digestão dos plasmídeos recombinantes com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, com a liberação de fragmentos de tamanhos esperados. Alíquotas de 1 µL dos produtos purificados de DNA plasmidial foram utilizados em uma nova PCR para verificar se os fragmentos liberados correspondiam ao fragmento de urease amplificado (resultados não apresentados).

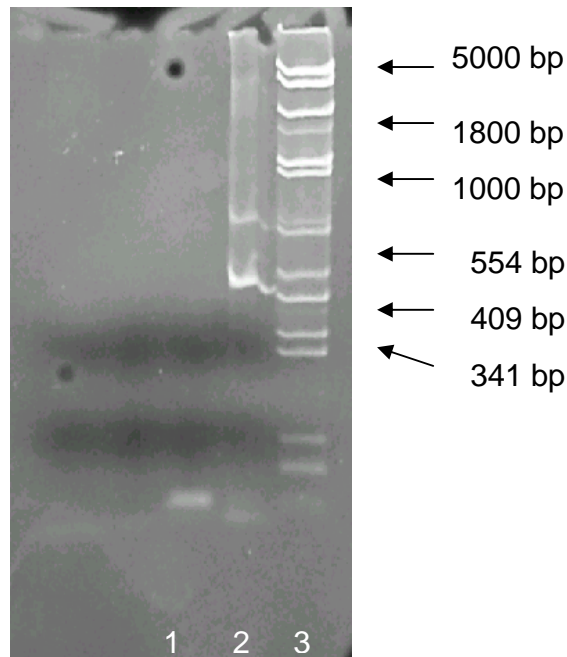


Figura 4: Resultado da amplificação de fragmentos de urease utilizando os primers GmUre1For e GmUre1Rev (Tabela 2). Produto de amplificação a partir de PCR de DNA genômico *G. max*. 1: Controle negativo da reação. 2: Reação de PCR. 3: Marcador de tamanho de fragmentos.

O fragmento de 300 pb, clonado em pUC18, foi seqüenciado em ambas as direções utilizando-se os mesmos *primers* da PCR. A seqüência obtida está reproduzida na Figura 5. Com o resultado do seqüenciamento, foi possível realizar análises *in silico* visando confirmar a homologia da seqüência obtida com os dados do GenBank. Para tal, a seqüência foi analisada pelo programa BLASTn, resultando em alinhamentos com ureases de plantas, bactérias e fungos. Os alinhamentos estão representados na Figura 5 e listados na Figura 6. As homologias observadas, da ordem de 99 % em relação à urease ubíqua e de 94 %

em relação à urease embrião-específica de soja, são a prova molecular de que a seqüência obtida é parte integrante de pelo menos um gene de urease da soja.



Figura 5: Resultados do alinhamento da seqüência obtida com as demais seqüências de urease depositadas no GenBank, utilizando o programa Clustalw, disponível no seguinte endereço eletrônico: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. Os asteriscos indicam a total identidade entre nucleotídeos das cinco seqüências.

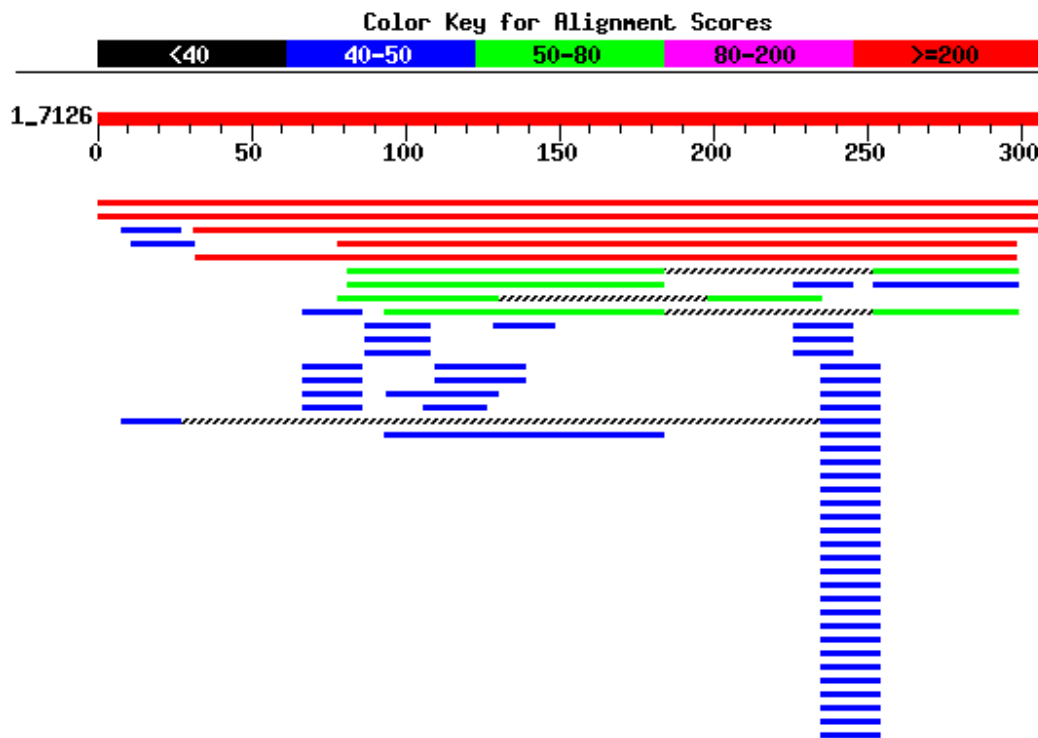


Figura 6: Representação esquemática do alinhamento da seqüência de urease obtida por PCR. A seqüência obtida foi submetida ao alinhamento contra o banco de dados GenBank, pelo programa BLASTn, disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Atualizado em fevereiro de 2005. A faixa vermelha mais alta refere-se à seqüência do produto de PCR e os números de 0 a 300 o tamanho da seqüência em pb. As regiões em vermelho, verde e azul são pontos de homologia (pontuação variando, respectivamente, acima de 200, entre 50 a 80 e entre 40 e 50, considerada mediana) com seqüências de genes de ureases. As regiões rachuradas representam espaços (*gaps*) inseridos pelo programa para o melhor alinhamento das regiões homólogas. As seqüências representadas pelas barras vermelhas, de mais alta homologia, designam as regiões homólogas das seqüências AY230156, urease ubíqua de soja; AJ276866, mRNA da urease de soja; AY230157, urease embrião-específica de soja; M65260, urease de *C. ensiformis*; e AF468788, urease JBUREII de *C. ensiformis*.

Com o objetivo de investigar o número de cópias de genes relacionados à urease em soja, foi realizada uma análise de hibridização de *Southern blot*, utilizado-se como sonda o fragmento correspondente à região amplificada por PCR. DNA genômico de *G. max* foi digerido com diferentes enzimas de restrição, que não possuem sítios de reconhecimento internos comuns à sonda utilizada. De acordo com a Figura 7, duas bandas de hibridização foram observadas em todas as canaletas. Este resultado sugere que, no genoma de *G. max*, há pelo menos dois genes codificantes de urease, confirmando dados prévios da literatura.

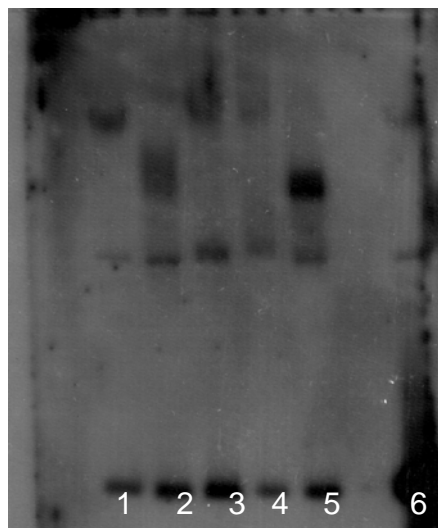


Figura 7: *Southern blot* de DNA genômico de *G. max* hibridizado com uma sonda correspondente a um fragmento de DNA de urease de soja, amplificado por PCR. 1: *Bam*HI; 2: *Kpn*I; 3: *Sal*I; 4: *Sma*I; 5: *Xba*I; 6: Controle positivo.

Na mesma época (novembro 2002) em que obtivemos esses resultados, foi divulgado no GenBank as seqüências completas codificadoras das ureases de soja, tanto da forma ubíqua (Número de Acesso GenBank: AY230156) quanto da forma embrião-específica (Número de Acesso GenBank: AY230157).

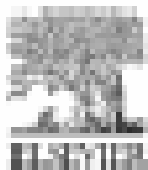
Diante da possibilidade de abreviar as etapas de clonagem desses genes, um dos objetivos iniciais dessa tese, solicitamos as respectivas seqüências aos pesquisadores responsáveis pelos depósitos das mesmas. Os cDNAs completos de ambas as isoformas de soja foram enviados.

O cDNA da urease embrião-específica, cedida pelo Dr Joseph Polacco – USA, consistia de um fragmento amplificado por PCR com tamanho de 2.700 pb.

O cDNA da urease ubíqua, cedida pelo Dr Mark Taylor – UK, já estava inserido no vetor pGPTV-JIT, adequado para transformação de plantas. Em face disso, avançamos em nossos objetivos iniciais, partindo para a obtenção da expressão heteróloga da urease ubíqua de soja em plantas de tabaco, como descrito no Capítulo 2.

## CAPÍTULO 2

### ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT AND BACTERIAL UREASES



## Antifungal activity of plant and bacterial ureases<sup>☆</sup>

A.B. Becker-Rim<sup>a</sup>, A.H.S. Martinelli<sup>a</sup>, S. Múcher<sup>b</sup>, V. Fieder<sup>c</sup>,  
G.E. Wassermann<sup>a</sup>, L. Souto<sup>a</sup>, M.H. Vainstein<sup>a,c</sup>, J.T.A. Oliveira<sup>d</sup>,  
L.M. Figuei<sup>e</sup>, G. Pasquati<sup>a,f</sup>, C.R. Carlini<sup>a,g,h</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Molecular and Cellular Biology, Course of Biotecnology,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul—UFRSJ, Brazil

<sup>b</sup>MaPac Biotecnological Development LTDA, Porto Alegre, Brazil  
<sup>c</sup>Department of Microbiology, UFRGS, Brazil

<sup>d</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil  
<sup>e</sup>Universidade do Vale dos Sinos, Vila Lajeado, RS, Brazil

<sup>f</sup>Department of Molecular Biology and Biotecnology, UFRGS, Brazil

<sup>g</sup>Department of Biophysics, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Funchal 91501, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

Received 20 April 2007; received in revised form 08 July 2007; accepted 08 July 2007

Available online 20 July 2007

### Abstract

Ureases (EC 3.5.1.3) are zinc metalloproteins that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide. Produced by plants, fungi and bacteria, but not by animals, ureases have been shown to be involved in different mechanisms of pathogenesis, at least in *Mycobacterium tuberculosis*. While fungal and plant ureases are known to ligate urea to proteins or to RNA molecules, bacterial ureases are well known to react (e.g., *Mycobacterium goodii*) with urea to form ureidylated proteins. It has been proposed that in plants these ureases are involved in nitrogen translocation and in protection against pathogens. Previous studies by our group have indicated that plant ureases, but not a bacterial *Shewanella putrefaciens* urease, display immunomodulatory activity. Herein we demonstrate that *Shewanella putrefaciens* urease, in addition (Clonally enough) to its urease and a ureidylase (i.e., *S. putrefaciens* urease) activity, is able to hydrolyze urea to form ammonium and carbon dioxide. This antifungal property of ureases is not affected by treatment of the proteins with a urease inhibitor or by urease activity. Since in yeast cells, immunogenicity of urease-treated fungi suggests pathogenicity and cell wall injuries. Altogether, our data indicate that ureases probably contribute to the plant defense of different components against pathogens and that the urease defense mechanism is independent of ammonia in relation to urea.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Antifungal proteins; Plant pathogens; Urease; Hydrolysis; Zinc ions; Biotecnological protein

<sup>☆</sup> A final version of this manuscript was prepared and approved by the Research and Ethics Committees of the Institute of Biotecnology, Federal University of Rio Grande do Sul.

Corresponding author. Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Funchal 91501, Brazil. Tel.: +55 51 33073000; fax: +55 51 33073023.

E-mail addresses: [carlini@ufrgs.br](mailto:carlini@ufrgs.br), [m.h.vainstein@ufrgs.br](mailto:m.h.vainstein@ufrgs.br) (C.R. Carlini).



## 1. Introduction

Ureases (EC 3.5.1.5, urea amidohydrolase) are nickel-dependent metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide (Dixon et al., 1975) widespread in plants, fungi and bacteria (Mebly and Blumberg, 1988). While fungal and plant ureases are homo-hexameric proteins of 90kDa subunits, bacterial ureases are multimers of two or three subunit complexes. The sequence similarity of all ureases indicates that they are variants of the same ancestral protein, and are likely to possess highly conserved tertiary structures and similar catalytic mechanisms (Mebly et al., 1995; Sirko and Brodskij, 2005). Some bacterial ureases, such as those from *Proteus mirabilis* and *Helicobacter pylori* (Mebly et al., 1988; Oliveira-Santos et al., 2005), play an important role in the pathogenesis of human and animal diseases. In the fungi *Coccidioides immitis* (Meredith-Donovan et al., 2004), *C. immitis* (Li et al., 2005), *Aspergillus fumigatus* (Rappleye and Goldman, 2006) and *Cryptosporidium parvum* (Cox et al., 2006; Gonzalez et al., 2008), urease production is also probably related to pathogenesis in humans.

Despite the abundance of ureases in plants, little has been revealed about their biological roles (Polacco and Holland, 1991; Sirko and Brodskij, 2005). Urease has been proposed to function coordinately with arginase in the utilization of urea and protein reserves during germination (Thompson, 1985). A second proposed role is the assimilation of urea derived from triolein metabolism (Shelp and Ireland, 1985) or imported from the environment since urea is an effective fertilizer (Zorita et al., 1995).

The best-studied urease derives from jackbean (*Canavalia maritima*) which was crystallized by Sumner (1936) representing the first crystals of a characterized enzyme. We described a family of urease-related genes in jackbean (Pires-Alves et al., 2003) and characterized an isoform of jackbean urease, named *canavainin* (Carlini and Colmarides, 1983; Follmer et al., 1991, 2004). Urease activity was found in all tissues of soybean plants (Polacco and Black, 1978; Eas et al., 2002). Soybean produces two urease isoenzymes (Holland et al., 1987) that share 87% identity at the amino acid level (Torley and Polacco, 1990; Galbraith et al., 2003). The embryo-specific urease, encoded by the *Jud6* gene, is synthesized only in the developing embryo (Polacco and Black, 1978; Polacco and

Winkler, 1984), while the so-called “obligate” urease, encoded by the *Jud5* gene, was found in all tissues examined (Polacco and Winkler, 1984; Stubbins et al., 1991). Although the obligate urease is present in seeds at 0.001–0.007% levels of that of the embryo-specific urease, this isoenzyme is responsible for recycling metabolically derived urea (Polacco et al., 1985; Stubbins et al., 1991; Witt et al., 2002). It has been suggested that the embryo-specific urease does not play a true assimilatory role and that it may be involved in seed chemical defense (Polacco and Holland, 1993).

Our group has shown that plant and microbial ureases display several biological properties that are independent of their catalytic activity, such as the activation of blood platelets, interaction with glycosaminoglycans and insecticidal activity (Follmer et al., 2001, 2004). Besides these activities, jackbean canavainin is also lethal to rats and mice by an intraperitoneal route (Carlini and Colmarides, 1983; Follmer et al., 2003) and inhibits the growth of phytopathogenic fungi (Oliveira et al., 1998). The non-catalytic effects of jackbean urease and of the soybean embryo-specific soybean urease persisted after treatment of the enzymes with an irreversible inhibitor, demonstrating that protein denaturation other than the active site might be involved (Follmer et al., 2004a,b). Actually, an internal non-catalytic peptide released upon digestion by insect cuticular proteases accounts for the insecticidal activity of canavainin (Carlini et al., 1997; Ferreira-da-Silva et al., 2000). These findings reinforce the hypothesis that ureases might be involved in plant defense mechanisms (Carlini and Gross-de-Sá, 2002). In the present work, we evaluated the inhibitory activities of two plant ureases and a bacterial urease on vegetative growth under upon germination of filamentous fungi, most of the most important plant pathogens.

## 2. Material and methods

### 2.1. Embryo-specific soybean urease (ASU) and jackbean urease (JBU)

Embryo-specific urease was isolated from a local commercial variety of soybeans according to Follmer et al. (2004a) except for the last step in the purification protocol aimed to separate urease isoforms. The jackbean (*major*) urease was purified from *C. maritima* seed according to Follmer et al. (2004a). Homogeneity of purified proteins was checked by SDS-PAGE. The purified embryo-specific

soybean trypsin (SBT) and jackbean trypsin (JBT) were kept in 10 mM sodium phosphate (NaPO<sub>4</sub>), pH 7.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, at 4 °C.

### 3.2. *M. pyrifera* recombinant trypsin (MPD)

*E. coli* SH-SH0 cells expressing *M. pyrifera* trypsin (McGee et al., 1999) were kindly provided by Dr. Harry L. Mobley, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA. The crude extract obtained from an overnight culture was fractionated with ammonium sulfate at 10–70% saturation. The trypsin-rich fraction was dialyzed against 10 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 1 mM EDTA, and mixed with Q-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech) (1 mL resin per 10 mg protein) equilibrated with the same buffer. Elution of trypsin-enriched fractions was achieved by adding 100 mM NaCl to the equilibrium buffer. The material was then applied into a Superose 6HR 10/30 column (Amersham-Pharmacia Biotech) equilibrated in the same buffer. Pooled fractions displaying trypsin activity were used in the experiments. Homogeneity of the purified protein was checked by SDS-PAGE.

### 3.3. Chemical modification of trypsin

Trypsin was treated with 0.1 mM *p*-hydroxymercuribenzoate (*p*-HMB, Sigma Chemical Co.) for 16 h at 4 °C and excess reagent was removed by exhaustive dialysis against 10 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.5, without  $\beta$ -mercaptoethanol (Feldner et al., 2004a) in the experiments using modified trypsin, the last change of dialysis buffer was used as control.

### 3.4. Protein content determination

The protein content of fractions was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

### 3.5. Trypsin activity

All assays of 50  $\mu$ L of 100 mM urea solution were mixed with protein samples and buffered with 10 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.5, to give a final volume of 50  $\mu$ L. Reaction mixtures were incubated for 15 min at 37 °C and the ammonia released was determined colorimetrically (Weatherberry, 1987). One unit of trypsin activity was defined as the

amount of moles required to release 1  $\mu$ mol NH<sub>3</sub> min<sup>-1</sup> at 37 °C and pH 7.5 under the conditions described.

### 3.6. Fungi

*Blastocaris adae*, *Amphisphaeria* sp., *Aspergillus niger* var. *Tribolium* var. *sp.*, *Trichoderma reesei* (ATCC 36287), *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp., *Colletotrichum roseum* and *Clostridium* spores were from fungal collections maintained at the Department of Microbiology and Molecular Biology, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, or at Universidade de Vale do São Rio, São Leopoldo, RS, Brazil. *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium glaucosporium* and *A. goebliae* strains were kindly provided by Dr. Valdemir Gross, Universidade Estadual de Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

### 3.7. Antifungal activity

- (1) *Aspergillus fumigatus* spores (10<sup>8</sup> in 100  $\mu$ L) were spread over the surface of Petri dishes (56-mm internal diameter) containing potato-dextrose-agar (PDA, Amersham Pharmacia Biotech) sterile filter paper discs (5-mm diameter, Whatman 1MM) loaded with about 40  $\mu$ L of protein solutions (11.5  $\mu$ g protein  $\mu$ L<sup>-1</sup> in 10 mM NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7.5) were placed in the center onto previously inoculated PDA plates. The dishes were inverted and then incubated at 28 °C. Antifungal activity was visualized as a zone of inhibition of fungal growth around the paper disc. Alternatively, to evaluate spore germination, 10<sup>6</sup> spores were suspended in 40  $\mu$ L of protein solutions (11.5  $\mu$ g protein  $\mu$ L<sup>-1</sup>), incubated for 1 h at 28 °C and then inoculated onto the PDA-containing Petri dishes. The toxic effect of trypsin was assessed by visual comparison of the mycelial development of protein-treated fungi and untreated controls.
- (2) *Trichoderma reesei* induction of fungal growth: Spores (10<sup>8</sup> in 100  $\mu$ L) were inoculated onto 96-well plates containing 100  $\mu$ L potato-dextrose broth (PDB, Becton Dickinson Co.) buffered to pH 7.0 with 10 mM NaPO<sub>4</sub> (to avoid precipitation of trypsin), containing 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and incubated at 28 °C for 16 h, followed by addition of 50  $\mu$ L of protein solutions in the same buffer (plus urea). As controls, 50  $\mu$ L buffer alone or 0.5% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

was used. The plates were incubated at 25°C without shaking and the absorbance at 410 nm ( $A_{410}$ ) was followed on a plate reader (Spectra-max, Molecular Devices) at 12 h intervals up to 72 h (Brookman et al., 1996).

### 3.5. Determination of antifungal $EC_{50}$

Concentrations of SHU that caused 50% inhibition of growth ( $EC_{50}$ ) were calculated for some fungi. Fungal growth of triplicates was measured turbidimetrically (as described above) in the presence of buffer (100% growth) or six different concentrations from 0.05 to 1.0  $\mu$ M of SHU. The protein concentrations relating growth to 50% of control values after 72 h were taken as  $EC_{50}$ .

### 3.6. Scanning electron microscopy

Preparation of samples for scanning electron microscopy (SEM) analysis was done according to Figueiró et al. (2006). *F. lateralis* mycelia cultured for 48 h in the turbidimetric assay in the absence or presence of 0.57  $\mu$ M SHU were recovered by filtration in paper filters (Whatman no. 1). The retained mycelial mass was fixed for 4 days at 4°C with 2% (v/v) glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.3. Post-fixation was carried out in 1% (v/v) osmium tetroxide in the same buffer. The specimens were rinsed in buffer, dehydrated in a series of 10–100% acetone solutions, dried at critical point in  $CO_2$  gPCD 0.05 BAL-TEC), and coated with gold in a sputter-coater (SCD 0.05 BAL-TEC). The material was examined in a Jeol SEM 005 scanning electron microscope at the Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CMR/UFRS) Porto Alegre, RS Brazil.

### 3.7. Statistical analysis

The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the significance of differences among means was determined by the Tukey test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Native and modified cresols

The catalytic specific activities of soybean embryo-specific cresol (SHU), jackbean major cresol (JBU) and *M. pylois* cresol (JBU) used in the

experiments were approximately 0.525, 1.63 and 1.52 U mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup> at pH 7.5, respectively. After treatment with *p*-hydroxy-methylbenzoate, which irreversibly blocks the enzymatic activity of cresols by alkylating a cysteine residue near the active site (Jaber et al., 1995) modified SHU or JBU showed less than 5% of their initial enzymatic activities.

### 3.2. Effect of cresols on fungal growth

As a first approach to test the antifungal properties of cresols, the ability of embryo-specific soybean cresol (SHU) to inhibit hyphal growth and the germination of fungal spores was investigated using a disc plate diffusion assay. Table 1 shows that SHU suppressed mycelial growth and/or inhibited spore germination of *F. solani*, *F. lateralis*, *C. lusitana* and three species of *Fusarium*. To obtain more quantitative data, inhibition of fungal growth was analyzed turbidimetrically in microtiter plates. Fig. 1 shows dose curves for the inhibitory effects of SHU upon the ascomycetes phytopathogens *C. vena*, the biological agent of antracnose in banana and the blue blight on Zea's grass, and *C. lusitana*, the most commonly associated organism with the crown rot disease, an important problem in export banana. Table 2 shows that SHU antifungal activity ( $EC_{50}$ ) in the turbidimetric assay is within the 0.1–1.0  $\mu$ M range for 4 out of 7 species of the tested fungi, including against *F. oxysporum*, a phytopathogen that causes wilt disease in more than a hundred species of plants. However, no antifungal activity was observed for *F. verticillioides* or *F. solani*. Fig. 2 compares the growth of seven different fungi after 48 and 72 h of exposure to 0.57  $\mu$ M of SHU or JBU. *C. vena* and *F. lateralis* (main pathogen) were affected by both cresols. SHU inhibited also the growth of *F. oxysporum*, but even the highest concentration tested for this protein (1.15  $\mu$ M) did not affect the growth of *F. solani*. Although *F. verticillioides* was inhibited by SHU in the agar plate tests (Table 1) it was not affected in liquid medium assay at the maximal dose tested (1.15  $\mu$ M). On the other hand, *F. solani* and *F. oxysporum* were inhibited only by JBU. Fig. 3 also shows that the antifungal effect of 0.57  $\mu$ M SHU was more persistent, with little or no change at 72 h as compared to 48 h exposition. In contrast, the inhibitory effect of JBU was short-lasting as the inhibition was at 48 h decreased or was overcome

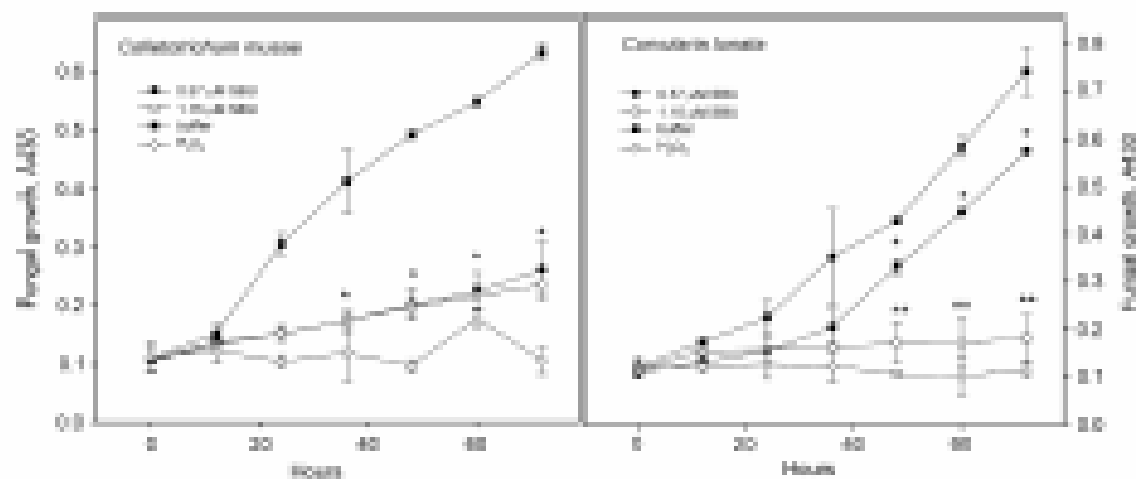
**Table 2**  
Antifungal activity of sulphur and arsenic on mycelial growth and spore germination of filamentous fungi

Fungi	Phylum/Genus/species (if any)	Antifungal activity <sup>a</sup>	
		Mycelial growth <sup>b</sup>	Spore germination <sup>b</sup>
<i>Aspergillus glaucus</i>	Ascomycota/Trichosporium Potential spore site on putrefaction of organic		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ascomycota/leaf rot on potato Plant pathogen		
<i>Corticium lanata</i>	Ascomycota/Tricomyces Plant pathogen	3.20 ± 0.70	+
<i>Asarion asyriacus</i>	Ascomycota/Tricomyces Plant pathogen		
<i>Asarion adoni</i>	Ascomycota/Tricomyces Plant pathogen		+
<i>Pestalotiopsis longipes</i>	Ascomycota/Trichosporium Plant pathogen, saprophyte in Ascomycota	3.00 ± 0.00	+
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	In flowers for gas, saprophyte in Ascomycota		
<i>Xenosia varia colorata</i>	Basidiomycota/Hemerocallis decomposer Plant pathogen		
<i>Tarichium pseudohirsutum</i>	Ascomycota/leaf rot on potato Plant pathogen	4.02 ± 0.00	+
<i>Tarichium</i> sp.	Ascomycota	+	+
<i>Tarichium arale</i>	Ascomycota/leaf rot on potato Saprophyte	2.70 ± 0.02	+

Leaf rot on potato and arsenic (100 µg/ml) were applied on a damp spot for the assay of mycelial growth inhibition or inoculated with spore suspension as described by Becker-Ribeiro (2004).

<sup>a</sup> Character in and location of infection sites were all at 60 h at 20 °C (mean ± SD, N = 3).

<sup>b</sup> +, inhibition of growth, as in Table 1.



**Fig. 5.** Inhibition of mycelial growth of *C. gloeosporioides* (left panel) and *C. lanata* (right panel). Spores (10<sup>7</sup> in 10 µL) of each fungus were inoculated into 10 mL potato tuber tubercles (100 µL of potato extract) buffer buffered to pH 7.0 with 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> containing 0 mM (as a replacement of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> incubation at 20 °C for 10 h, 10 µL of 0% H<sub>2</sub>S solution in the same buffer were added to the media. As controls, 10 µL buffer alone or 0.01% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used. Ten potato tuber tubercles were inoculated at 20 °C and the absorbance at 600 nm (OD<sub>600</sub>) was read every 12 h up to 100 h. Data shown (mean ± SD, 10 replicates) were the mean response to 1 unit of H<sub>2</sub>S and 1 unit of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with similar results. Values are divided by (\*) or (\*\*) are statistically different from the equal gas with 10 h preincubation (Student's *t*-test according to Becker-Ribeiro (2004) or ANOVA, respectively).

**Table 2**  
Antifungal activity (IC<sub>50</sub>) of *SBU* and *IBU*

Fungus	IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )
<i>Aspergillus nidulans</i>	NI
<i>Colletotrichum gloeosporium</i>	0.80 ± 0.04
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0.80 ± 0.02
<i>Trichoderma reesei</i>	NI
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0.27 ± 0.02
<i>Penicillium oxalicum</i>	0.80 ± 0.02

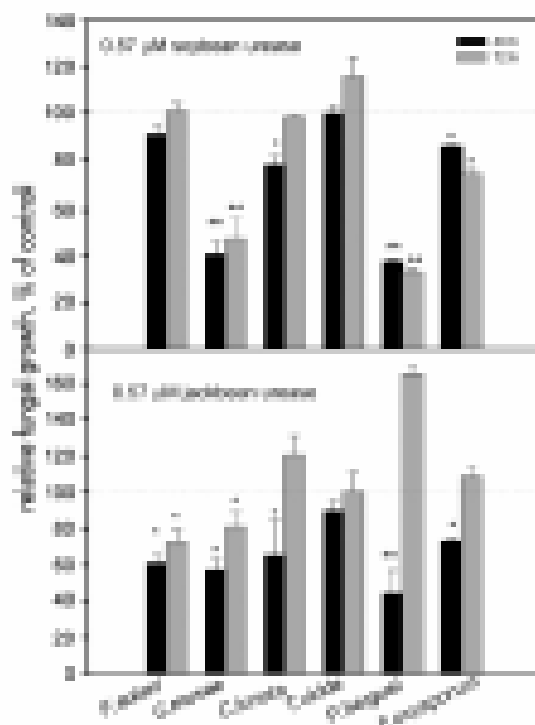
Fungal growth in 10 µl droplets was measured in 96-well microtiter plates (as described above) in the presence of 100% growth or six different concentrations (0.001–0.01 µg ml<sup>-1</sup>) of *SBU*. The protein concentration *in vitro* giving growth to 50% of control values after 72 h were taken as IC<sub>50</sub>. Values are mean ± SD of 3 replicates (n = 3). NI, no inhibition of the microbial development.

by most fungi at 72 h. For *C. jeikeium* and *P. brevicompactum* inhibition caused by 0.57 µM *IBU* at 48 h gives place to an increased growth after 72 h. Control experiments in which *SBU* and *IBU* were subjected to the same incubation time (72 h) and temperature (28 °C) in the absence of fungi indicated that the proteins retained their activities without appreciable loss of enzymatic activity.

Fig. 3 shows that the recombinant *M. pyruvici* cream also inhibited the mycelial growth of *P. brevicompactum* and *C. jeikeium*. Although the microbial mycelium shows 3- to 5-fold higher proteolytic activity as compared to *IBU* or *SBU*, respectively; it was insufficient to inhibit fungal growth when the same dose of the three proteins was used.

### 3.3. Antifungal effect of urea and its correlation to the enzymatic activity

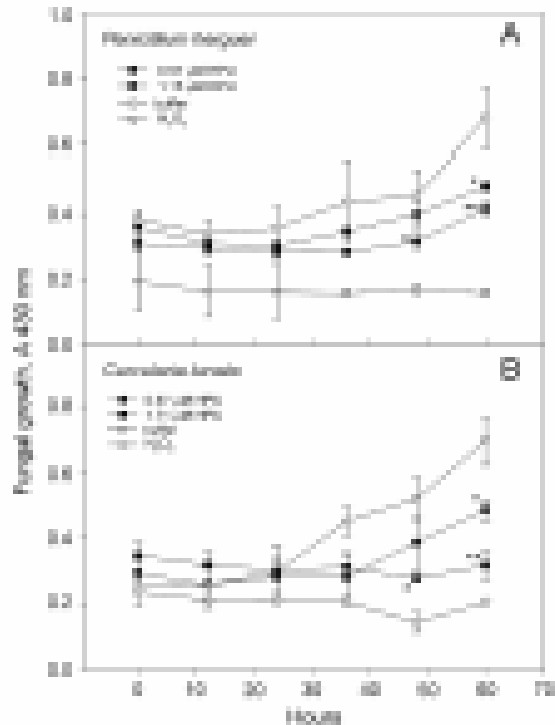
The lower antifungal activity of *IBU* suggested that ammonia release is not important for the protein's fungicidal/fungistatic property. To assess the involvement of the enzymatic activity of *SBU* and *IBU* in their antifungal property, *p*-hydroxy-methylbenzoate-inactivated mycelium (*mSBU* and *mIBU*, respectively) were tested on *P. brevicompactum* (highly sensitive) and *C. jeikeium* (moderately sensitive) development. Fig. 4 shows that modified *IBU*, although devoid of proteolytic activity, was fungicidal. The same result was obtained with modified *SBU* (not shown) indicating that the proteolytic activity of the proteins does not contribute to their antifungal effect.



**Fig. 3.** Inhibitory effect of different fungi in urease (upper panel) and penicillin G cream (lower panel) against *Aspergillus* (10<sup>7</sup> to 10<sup>8</sup> µL) were incubated at a pH 7.0 and pH 5.0, respectively, using 100 µL of 100 mM HEPES buffer at pH 7.0 with 10 mM NaOH, 1 mM β-mercaptoethanol, incubated at 28 °C for 72 h, and then 10 µL of the protein solution at a final concentration were added to the wells. The plates were incubated at 28 °C for 48 h in the absence case of 100 mM (data not shown) was recorded. Data (mean ± SD) of triplicate points are expressed as percentage of average control growth in the presence of buffer alone. Data represent the sum of at least three wells and averages in the case. Values indicated by (\*) or (\*\*) are statistically different from fungal growth in the presence of the 100% according to Tukey's test (p < 0.05 or 0.01, respectively).

### 3.4. Scanning electron microscopy analysis

Marked reduction in the viability of the growing cultures was seen under the present experimental conditions. In control *P. brevicompactum* hyphae appeared linear, elongated and with smooth surfaces (Fig. 5). In contrast, fungi treated with *SBU* or *IBU* showed negative hyphae appearing branched, disorganized and collapsed, some with distorted ends. Other important alterations of *P. brevicompactum* in the presence of urease include cell enlargement (distended balloon-shaped cells), irregularities of the hyphal surface, abnormal hyphal overgrowth and regions of the cell wall, suggestive of plasmolysis.



**Fig. 3.** Effect of *M. pyloricus* (HP1) on fungal growth. Spores ( $10^7$  to  $10^8$ ) of *B. longus* (panel A) or *C. leucae* (panel B) were inoculated onto 96-well plates containing 100  $\mu$ l of PDB adjusted to pH 5.0 with 10 mM NaOH, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, incubated at 20°C for 10 h, and then 50  $\mu$ l of HP1 solution in the same buffer was added to the wells. As control, 50  $\mu$ l buffer alone or 5.0% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used. The plates were incubated at 20°C and the absorbance at 450 nm (OD) was read every 10 h up to 70 h. Data shown (as mean  $\pm$  SD of triplicate points) are from one experiment and at least three with similar results. Means indicated by (\*) or (\*\*) are statistically different from fungal growth in the presence of buffer according to Tukey's test ( $p < 0.05$  or  $0.02$ , resp. values).

#### 4. Discussion

Antifungal peptides and proteins are among the arsenal of nonparasitic plants produce to combat phytopathogenic fungi (Brockhart et al., 1997; Siliverdov, 2001; Thomma et al., 2002; De Luca et al., 2003). Transgenic plants expressing antifungal proteins are expected to be resistant to the devastating damage caused by fungal infections (De Luca, 2004, 2005). Several families of antifungal plant proteins have been isolated from different organs (seed, leaves and flowers) and harvested fields. Major groups of plants proteins with antifungal activity comprise thionin-like

proteins, chitinases, chitin-binding proteins, defensins, defensin-like proteins, ribonuclease-inactivating proteins, lipid transfer protein-like proteins, protease inhibitors and lectins, among others (Brockhart et al., 1997; De Luca, 2004, 2005; Siliverdov, 2001).

To our knowledge, there are no reports so far on the isolation of antifungal proteins from plants of the *Cassia* genus. The glucose mannose lectins from *C. mesferri* (nonamarulin A) and from the closely related *C. glabrate* are devoid of antifungal activity (Wang and Ng, 2007; Wong and Ng, 2005). An melibioninase (Schindler et al., 1998) and an lectinized chitinase-like protein (nonamarulin B, (Blangsted et al., 1995) were isolated from *C. mesferri*, but they were not assayed for antifungal properties.

In soybeans, volatile derived from the enzymatic action of lipoygenase are able to inhibit the growth of *Aspergillus flavus* and the production of aflatoxins (Bose et al., 2005). Glycojarin, a protein (25 kDa) homologous to chitin synthase isolated from the black soybean *Glycine soja* showed potent antifungal activity against the fungi *F. oxysporum* and *Mycoaphanidum vesicicola* (Ngai and Ng, 2001).

Regarding *M. pyloric* it has been shown that HP (L1), a meliponin-like peptide derived from the N-terminal region of the ribosomal protein L1, possesses antimicrobial activity and acts as antifungal agent by damaging the plasma membrane of *Candida albicans* (Ribeiro and Medina-Acosta, 2001).

In this work, we showed that the major jakibean trypsin and the soybean seed trypsin were able to inhibit the vegetative growth and/or germination of several filamentous fungi at sub-micromolar concentrations. Although less active, the two-chain trypsin of *M. pyloric* was also detrimental to fungal growth. Caseinoin, an isoform of jakibean trypsin, was previously shown to inhibit the growth of the phytopathogenic fungi *Microsporangium phaseolae*, *Sclerotinia rostrata* and *Colletotrichum gloeosporioides* using 1 mg purified protein in a disc plate diffusion assay (Cabrera et al., 1999).

Little is known about the physiological role of trypsin, especially in plants. A principal shared by many is that trypsin plays no major role in plants because its substrate, trypsin, is not a major plant metabolite (Polacco and Richard, 1997).

The distribution and accumulation pattern of trypsin in leguminous seeds during embryo maturation are

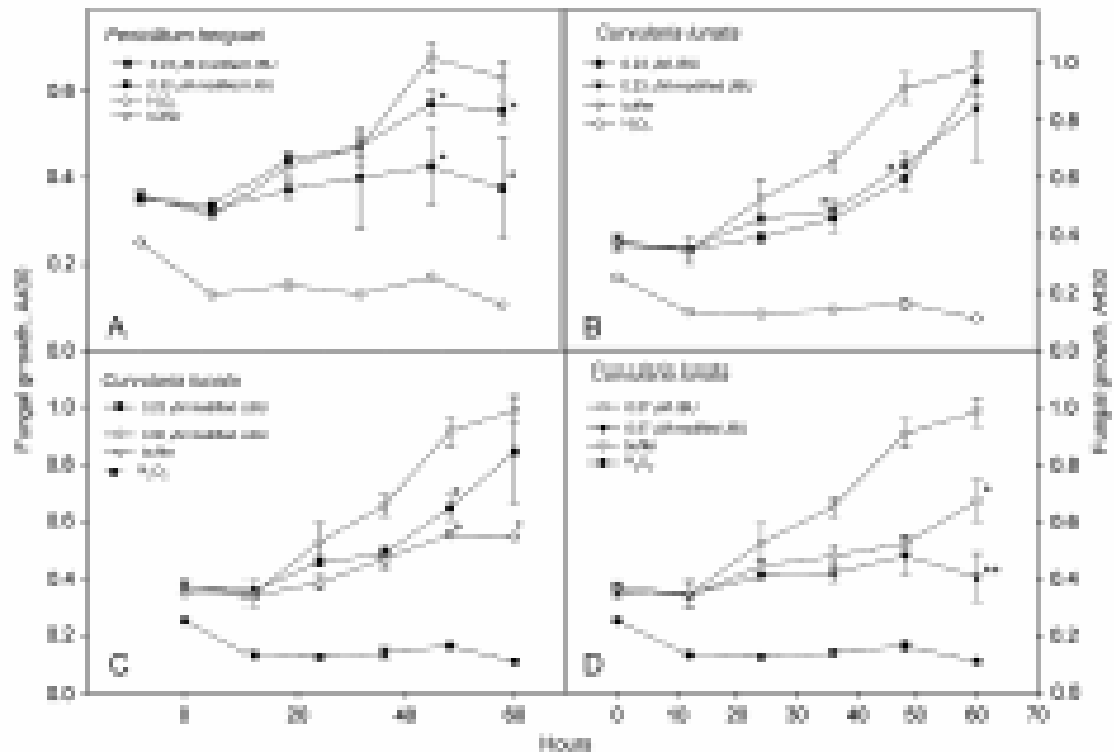


Fig. 4. Effect of *p*-hydroxy-murichromone on fungal growth. Spores ( $10^7$  in 100  $\mu$ L) of *P. brevicompactum* (panel A) or *C. lanata* (panels B–D) were inoculated onto 50  $\mu$ L of potato dextrose broth (100  $\mu$ L of PDB) buffered to a pH 5.0 with 10 mM NaOH. 100  $\mu$ L (average turbidity) is incubated at 28 °C for 60 h, and then 100  $\mu$ L of culture is transferred to 100  $\mu$ L of either a 0.1% or 1% solution of PDM solution was added to the media. As a control, 100  $\mu$ L of 1%  $H_2O_2$  was used. The plasmid was incubated at 28 °C and the absorbance at 630 nm ( $A_{630}$ ) was read every 10 h up to 60 h. Data shown (mean  $\pm$  SD) of triplicate points are from one experiment out of at least three with each for mean  $A_{630}$  values indicated by (\*) or (\*\*\*) are statistically different from fungal growth in the presence of the compound by Tukey's test ( $p < 0.05$  or  $0.01$ , respectively).

suggestive of an important physiological role. Both jackbean trypsin isoforms and the embryonic pig soybean trypsin present zymotonic activity, but not the tri-chain bacterial trypsin from *Bacteroides pectinovorus* [Follmer et al., 2004a, b]. The zymotonicity relies on an internal fragment of the protein released upon hydrolysis by insect or plant proteases [Ferreira-DaSilva et al., 2007]. The lack of zymotonic properties of *B. pectinovorus* trypsin is probably related to the absence of part of this zymotonic peptide, whose amino acid sequence corresponds to a gap between the C-terminal of B chain and the N-terminal of the C chain of the bacterial trypsin [Follmer et al., 2004a]. Here we show that *M. pyrae* trypsin has fungicidal activity. This two-chain bacterial trypsin lacks the same part of the protein molecule as the *B. pectinovorus* trypsin when both are compared to one-chain plant trypsin (Fig. 6). Thus,

it can be concluded that the internal fragment of plant trypsin displaying zymotonic activity is not involved in the fungicidal property of plant and *M. pyrae* trypsin. Confirming this hypothesis, we observed that a recombinant zymotonic peptide derived from an isoform of jackbean trypsin (gabonin-like) did not affect the growth of different fungi (unpublished data).

The antifungal activity of trypsin is not related to their zymotonic activity. This was shown by the lower antifungal effect of the more zymotonic active *M. pyrae* trypsin, as well as by the persistence of the antifungal properties of plant trypsin irreversibly inactivated by *p*-hydroxy-murichromone. Camacho is devoid of chitinase and proteinase inhibitory activities [Chini et al., 1997] which could account for the antifungal property of the jackbean trypsin. Preliminary results showed that

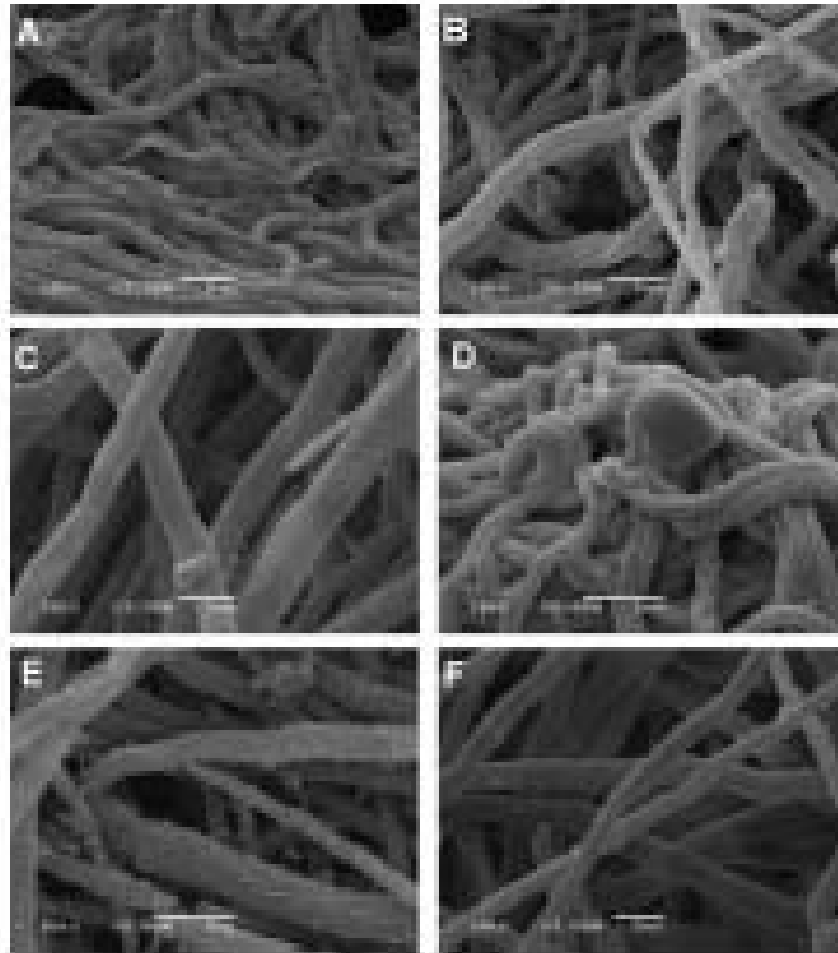


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *P. tomentosus*. The fungi were fixed after 48 h of incubation at 25 °C in the absence (panels C and F) or presence of 1.0% (v/v) of soybean extract (panels A and D) or jackfruit extract (panels B and E). White bars: 2 µm.

BEU is also able to inhibit the growth of the oomycete *Pythium oligosporum* when cell walls lack chitin, reinforcing that the antifungal property of cream probably does not involve a chitin-binding or chitinase activity.

The antifungal properties of cream affected fungi pertaining to Ascomycota and Basidiomycota. On the other hand, not all fungi tested were affected under our experimental conditions, with contrasting responses seen even at grass level. We have not been yet to the factors that dictate the sensitivity of different fungi to cream antifungal activity.

The antifungal activity of plant distillates, such as Pull and Pull2, isolated from *Rhus coriaria* (Palomida et al., 2009) appears to require specific binding to membrane targets, particularly glycosphingolipids, resulting in fungal growth arrest (Thibault et al., 2004, 2005). Carbohydrate-binding properties are also a common feature of *M. pyrae* cream (Sandoval et al., 2000; Aphelut-Sherif et al., 2004), jackfruit cream (Folmer et al., 2007) and some antifungal plant lectins (Liang et al., 1993), such as that of the stringing needle agglutinin (Eaton et al., 1999) or from the legume *Jatropha gossypifolia curatiana* (Mishra et al., 2005). Thus,





the sugar composition of fungal cells might be implicated in the difference of their susceptibility to trypsin.

The effect of trypsin on the morphology of *P. inguaz*, a maize pathogen, was investigated. Scanning electron microscopy of trypsin-treated fungi revealed that cell wall is damaged, suggesting that trypsin may interfere with the osmotic balance, as described for other fungi on *Aspergillus fumigatus* (Nishiyama et al., 2005).

Most fungi are able to hydrolyze urea into ammonia. In some fungi, urea is hydrolyzed by trypsin, a ribitol-containing enzyme homologous to the plant and bacterial enzymes studied in this work. In other fungi, urea is first carbonylated to yield allophanate by an ATP-hydrolyzing trypsin or urea amidohydrolase (Nishiyama and Inamura, 1993; Somanah et al., 1982). We are presently testing fungal trypsins for the ureolytic independent properties displayed by plant and microbial trypsins.

In conclusion, the antifungal properties of plant and bacterial trypsins we described here may shed some light on the physiological roles of these proteins. The data presented further reinforces the possibility of a protective role of plant trypsin besides phytophagous insects also against phytopathogenic fungi.

**Acknowledgments**

The authors wish to thank Dra Yádjira Gomes (UNIF, Brazil) for kindly providing some of the fungi used in this work; and Dr. Osana Cristina de Lima (Department of Micrology, Fundação Getúlio Vargas, Instituto Marquês, Rio de Janeiro, Brazil) for helpful discussions on the microscopy analyses. We are grateful to Dr. Joseph C. Pedazo, University of Missouri, Columbia, MO, USA, for suggestions and critical reading of the manuscript. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

**References**

Almeida, M.A., Calvetti, K.M.A., Nogueira, R.B., Karstenhofs, B., 2008. Characterization of trypsin isoforms obtained from *Phaseolus vulgaris* and *Arachis hypogaea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 470, 278–288.

Appl. Gen. Hortig, M., Doldigi, G., Lehmann, M., Kuhn, A., Herz, H., Rieder, N., Vokrouzek, B., Spitzmuller, B., Lindner, B., Bielewicz, A., Kaufmann, C., Arampik, A., Mikhlin, I., Nilsson, U.J., Velupillai, B., Gilman, B.H., Gohard, M., Altmann, T., Lopez-Rivas, M., Nishimura, T., Pao, S.C., Gomez, P., Choudhury-Balla, M.C., From-Primo, G.L., Henny, M.L., Narasimh, I., Carlisle, I., Chantson, S., Wierberg, B., Berg, D.B., Barton, T., 2008. Prediction of nitrogen fixation (N-fix) by *N-fix* of ABEI-like group on legume nodules with *N-fix*. *Plant* 10, 100–102.

Bass, L.A., Bitt, R.V., Carter-Nelson, C.H., Cleveland, T.H., 2008. Effect of urease hydrolysis on soil nitrogen and the effect of nitrogen fertilizer on soybean growth. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4778–4783.

Bredford, M.D., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a dye-binding procedure. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brockner, W.P., Trevis, P.R.C., Cassaro, R.P.A., Mader, J., 1998. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *PLoS Microbiol.* 4, 10–18.

Brockner, W.P., Cassaro, R.P.A., Di Biase, M.P.C., Thomaz, K., Di Giancamillo, G.W., De Souza, R.W., 1997. Antifungal peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 287–323.

Carlisle, C.B., Choudhury, B., 2002. Plant toxin proteins with insecticidal properties: A review on their potential utility as bioinsecticides. *Trends Plant Sci.* 7, 100–105.

Carlisle, C.B., Choudhury, B., 1998. Inhibition and cleavage activation of a toxin protein from *Conium maculatum* (jack bean) trypsin inhibitor for a commercial. *J. Toxicol.* 19, 167–176.

Carlisle, C.B., Oliveira, A.B., Assunção, P., Xavier-Filho, J., Wada, M.A., 1997. The logical effects of trypsin on different insect models: evidence for a proteolytic mechanism of the toxin by insects of lepidopteran species. *J. Econ. Entomol.* 80, 340–346.

Chen, D.M., Nishiyama, I., Cole, G.T., Casanovi, A., Pridemore, H., 2008. Urease as a virulence factor in experimental apple rot. *Plant Dis.* 92, 643–648.

Chen, N., Kuylenstierna, A.M., Bergman, P.E., 2002. Purification and characterization of a trypsin from the cultured pigweed (*Cyperus sp.* L.) variety. *Physicochemistry* 30, 103–108.

De Lencastre, A.J., 2008. Antifungal peptides: potential candidates for the treatment of fungal infections. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 273–280.

De Lencastre, A.J., Cleland, J., T.B., Wright, D.B., 2005. Plant-derived cysteine protease and papain. *Chem. J. Mater. Sci.* 18, 1000–1004.

Dixon, N.B., Caspary, C., Wierberg, B., Hildebrand, R.L., Arroyo, B., 1978. Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by urea hydrolytic acid and by phosphoramide. *Antonie van Leeuwenhoek* 44, 103–108.

Dixon, M.P., Houtman, F.M., Doldigi, H.L., Kaufmann, M.C., 1998. Purifying, coupling, and utilizing activity of the glycoalkaloids in the protein database. *Plant Physiol.* 118, 428–430.

Figueroa, J., Arceles, W., Solorzano, A., Martínez, M.H., 2008. An efficient method to purify samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. *J. Microbiol. Methods* 74, 488–495.

Freitas, Delfino, C.T., Choudhury, M.C., Somanah, H., Oliveira, C.M., Carlisle, C.B., 2008. Purification and characterization of a plant toxin protein, by insects collembolans in vitro. *Arch. Inst. Biol.* 56, 102–108.

- Pollmer, C., Bravado, C.B.R., Nagel, R.R., Mochales, G.L.T., Allen, R.W., Raza-Pedigo, C., Chalmers, J.A., Collins, C.R., 2003. Camalexin, a toxic protein from jack bean [*Canavalia ensiformis*], is a natural form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 369, 337–338.
- Pollmer, C., Real-Chaves, R., Wenzmann, G.B., O'Brien, D., Collins, C.R., 2003. Jack bean, urease and its bacterial paracatalytic ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 270, 1387–1393.
- Pollmer, C., Wenzmann, G.B., Collins, C.R., 2003. Inactivation of jack bean [*Canavalia ensiformis*] urease isoforms by an engineered anti-oxidant by site mutagenesis and characterization of interfacial properties unrelated to ureolytic activity. *Plant J.* 37, 249–259.
- Quintá, A., Rossmay, L.J., Pollmer, J.C., 2003. Nitrocellulose complexed with a *Trichoderma reesei* urease coating leaves of soybean. *Plant Physiol.* 133, 1888–1893.
- Ramirez, M., Zamora, J.N., Yáñez-Ruiz, A.C.T., Djalma, R.W., Salazar, R., 1999. Crystal structure of urease and role of L18 arginine residue in its activation in *Canavalia ensiformis*. *E. Mol. Biol.* 24, 237–248.
- Reid, M.A., Griffin, J.D., Meyer-Rilking, L.B., Pollmer, J.C., 1993. Developmental genetics of the soybean urease isozyme. *Dev. Genet.* 14, 278–283.
- Reid, P.C., Goshima, H., Kato, M., Kato, Y., 2000. Acid-dependent activation of *Trichoderma reesei* urease by direct phosphorylation. *Glycoconjugate J.* 17, 389–393.
- Reid, B., Gao, M.B., Hueston, R.P., Karpas, P.A., 1999. The crystal structure of urease from *Dielsia ureopora*. *Structure* 7, 899–904.
- Li, K., Ye, J.J., Huang, C.Y., Lehman, F.P., Cole, G.T., 2000. Recombinant urease and urease-DNA of *Canavalia ensiformis* elicit an immune response against viral infection in mice. *Infect. Immun.* 68, 3078–3083.
- Lunga, M., Moriconi, S., Barile, L., Vanasco, V., Molloy, C., 1999. Inhibition of some plant pathogenic fungus growth by urease. *Biochimica J.* 35, 89–93.
- Maclean, D.A., May, C.A., Omer, R.M., Haged, J.M., Moberg, H.T., 1998. Isolation of *Trichoderma reesei* genes that are induced in urease activity. *E. Biotechnol.* 10, 2673–2684.
- Melo, Y.M.M., Yáñez-Ruiz, A.C.T., Gama, M.V., De Castro, M., Soares, A.A., Oliveira, L.T.A., 2005. Effect of *Ascochyta blight* on fungal growth. *Plant J.* 46, 129–138.
- Michael-Olsen, P., Schulze, R., Huang, C.Y., Xie, J.M., Reinhard, U., Cole, G.T., 2000. Urease produced by *Canavalia ensiformis* contributes to the virulence of the respiratory pathogen. *Infect. Immun.* 68, 884–889.
- Molloy, H.L., Hueston, R.P., 1999. Microbial urease: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 63, 89–100.
- Molloy, H.L., Reid, M.A., Hueston, R.P., 1999. Molecular biology of microbial urease. *Microbiol. Rev.* 63, 899–900.
- Ngai, P.H.K., Ng, T.B., 2003. Purification of glycoprotein, an antifungal protein, from the jack bean urease *Canavalia ensiformis*. *Cell Mol. Biol.* 49, 387–394.
- Nishida, Y., Inoue, T., 1993. Cloning and molecular sequence of the urease gene from *Canavalia ensiformis*. *E. Plant. Biotech.* 7, 261–263.
- Nishida, Y., Hasegawa, Y., Ueda, K., Uchida, K., Yamaguchi, H., 2005. Effects of microalgae on the morphology of *Aspergillus fumigatus*. *E. Microb. Biotechnol.* 14, 87–93.
- O'Brien, A.B., Chaves, Y.M., Salay, M.P., Hernandez, K.V., Collins, C.R., Xavier-Pérez, J., 1999. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] urease to a plant pathogen in fungi. *Eur. J. Biochem.* 26, 89–92.
- O'Brien, D., Wenzmann, G.B., Collins, C.R., 2000. Urease display: biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to disease caused by urease gene during infection? *Eur. J. Mol. Biol. Rev.* 35, 889–890.
- Oliveira, M.A., Nasser, M.C., Chen, G.H., Torres, G.B., Cao, G.H., Freitas, L.R., Hueston, R.P., 2004. Urease gene mutation by *Cryptosporidium parvum* from sheep causes urease inactivation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1030, 173–178.
- Pere-Alonso, M., Cruzado-Alfaro, M.P., Bravado, C.B.R., Collins, C.R., Wenzmann, G.B., 2003. Characterization and expression of an urease inhibitor (UREBI) of the urease gene family from jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol.* 44, 109–115.
- Pollmer, J.C., Hueston, R.P., 1978. Comparison of urease activities in leaf and root of the jack bean. *E. Biol. Chem.* 253, 1287–1290.
- Pollmer, J.C., Holand, M.A., 1993. Role of a urease in plant cells. *Eur. J. Biochem.* 205, 89–100.
- Pollmer, J.C., Waddler, R.C., 1994. Soybean leaf urease: a natural form of *Plant Physiol.* 104, 889–893.
- Pollmer, J.C., Krueger, R.W., Waddler, R.C., 1990. Isolation and partial sequence determination of the coding sequence of urease. *Plant Physiol.* 78, 784–788.
- Ruppel, C.A., Collins, C.R., 2000. Defining resistance genes in the disease spot in fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 54, 281–303.
- Salazar, R.D., Salazar-Arenas, R., 2003. Prevention of leaf necrosis caused by urease of *Trichoderma reesei* in soybean leaves. *E. Phytochem.* 54, 1007–1014.
- Salazar, R., Kuri, G., Hernandez, C., 1999. Characterization of a class II chitinase from jack bean [*Canavalia ensiformis*] seeds. *Phytochem. Res.* 14, 179–183.
- Salazar, R.D., C.P., 2000. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 209–2094.
- Salay, M., Bravado, C.B.R., 1999. Urease urease elicits in leaves of *Trichoderma reesei* urease plant. *Plant Physiol.* 111, 278–283.
- Silva, A., Bravado, C.B.R., 2000. Plant urease: relevance of regulation. *Acta Biochimica Pol.* 47, 1009–1019.
- Stebbins, N., Holland, M.A., Collins, C.R., Pollmer, J.C., 1999. Genetic test of the role of the ureolytic activity of urease. *Plant Physiol.* 111, 1004–1008.
- Stewart, J.B., 1978. The isolation and crystallization of the urease gene. *E. Biol. Chem.* 253, 429–430.
- Stewart, R.A., Gohil, G., Gupta, T.C., 1992. Functional cloning of urease gene in *Trichosporon reesei*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 889–894.
- Tanaka, K., Wenzmann, G.B., Pollmer, J.C., Leppik, M., Heise, H., Oh, C., Zehring, U., Thomas, R.P.H., Prasad, K.K.A., Gama, M.V., 2004. Effect of urease on the growth and plant infection of the fungal phytopathogen *Ascochyta blight*. *E. Biol. Chem.* 279, 10019–10025.
- Thomas, R., Pollmer, J.C.A., Aris, A.M., Gama, M.V., 2000. Fungal phytopathogen targets for the development of urease antifungal heterologous *Carex Drug Targets* 1, 103–108.
- Thomas, R.P.H., Gama, M.V., Tanaka, K., 2002. Plant infection by *Ascochyta blight*. *Plant J.* 33, 103–103.
- Thomas, R.P., 1999. In *Microb. Mol. Biol.*, The Microbiology of Plants. Academic Press, New York, pp. 25–40.

- Trostky, B.B., Polunin, N.C., 2005. In plants, acetylcholine has not been shown to regulate synthesis during ontogeny development. *Plant Physiol.* 161, 1001–1009.
- Wang, H.X., Ng, T.H., 2003. An acetylcholinergic peptide from rat leaf axons. *Peptides* 24, 1027–1032.
- Wentworth, M.W., 1992. Fluorescence resonance energy transfer determination of acetylcholine. *Anal. Chem.* 64, 870–874.
- Wong, C.P., Miller, S.A., Taylor, M.A., Dunlop, H.V., 2002. Leaf axon metabolism in potato. Urea activity profile and patterns of recovery and distribution of  $^{15}\text{N}$  after foliar use application in wild-type and transgenic transgenic. *Plant Physiol.* 128, 1029–1038.
- Wong, C.H., Ng, T.H., 2005. Isolation and characterization of a glutamate acetylcholinesterase gene from the leaf from *Gemmaria glabra*. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 91–98.
- Zhao, L.H., Robbins, M.H., Polunin, N.C., 2005. Essential role of acetylcholine production of nitrogen-fixing *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Plant Physiol.* 137, 1097–1103.

## **CAPÍTULO 3**

**Título:**

**Expressão da urease ubíqua de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]  
em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)  
e atividade antifúngica das ureases de soja**

Esse capítulo consta de um manuscrito submetido à publicação no periódico:

Plant and Cell Physiology, em fevereiro de 2005.

Plant and Cell Physiology, submetido.

Expression of soybean (*Glycine max* (L) Merrill) ubiquitous urease in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and antifungal activity of soybean ureases

Becker-Ritt, A.B.<sup>(1)</sup>.; Martinelli, A.H.S.<sup>(1)</sup>.; Mitidieri, S.<sup>(2)</sup>.; Fiuza, L.M. <sup>(3)</sup>.; Carlini, C.R.<sup>(1,4)</sup>.; Pasquali, G<sup>(1,5)</sup>

<sup>(1)</sup>Graduate Program in Molecular and Cellular Biology – Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS; <sup>(2)</sup> Faculty of Pharmacy, UFRGS; <sup>(3)</sup>Center of Life Science, University of the Vale dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, RS; <sup>(4)</sup>Department of Biophysics, UFRGS and <sup>(5)</sup>Department of Molecular Biology and Biotechnology, UFRGS, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil.

Corresponding author:

Célia R. Carlini

Department of Biophysics

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43.422

91501-970 Porto Alegre – RS, Brazil

+ 55 51 3316 7606

e-mail: ccarlini@ufrgs.br

## Abstract

Ureases (EC 3.5.1.5) are nickel-dependent metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide, and are widely distributed in plants, fungi and bacteria. Little is known about the function of these enzymes in plants. It has been proposed that these enzymes are involved in nitrogen bioavailability and in the protection against plant pathogens. Soybean (*Glycine max*) has two urease isoenzymes, a ubiquitous and an embryo-specific form, both sharing immunoreactivity with jackbean (*Canavalia ensiformis*) ureases. We have transformed tobacco plants for expressing the soybean ubiquitous urease and obtained 12 transgenic plants showing normal growth and phenotype. Southern blots indicated single or multiple copies of the transgene integrated into plant genomes. Leaf extracts of transgenic plants were analyzed for urease activity, and immunoreactivity against anti-jackbean urease antibodies. The ability of the embryo-specific urease isolated from wild-type seeds to impair growth of selected phytopathogens was compared to that of leaf extracts of transgenic plants. The antifungal activity correlated with the content/activity of the recombinant soybean ubiquitous urease in leaves of transgenic tobacco. The data suggest that urease over expression in transgenic plants may help to improve plant resistance against phytopathogenic fungi, besides its known deterrent effect on insects.

Keywords: plant pathogen, soybean, tobacco, transgenic plant, urease.

## Introduction

Ureases (EC 3.5.1.5, urea amidohydrolase) are nickel-dependent metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide (Dixon et al. 1975) and are widespread in plants, fungi and bacteria (Mobley and Hausinger 1989). While fungal and plant (e.g. jackbean and soybean) ureases are homooligomeric proteins of 90 kDa subunits, bacterial ureases are multimers of two or three subunit complexes (Mobley et al. 1995, Sirko and Brodzik 2000). The high sequence similarity of all ureases indicates that they are variants of the same ancestral protein and are likely to possess highly conserved and similar tertiary structures and catalytic mechanisms (Mobley et al. 1995).

Despite the abundance of ureases in some plant tissues, mainly in seeds of some members of the families Fabaceae (Leguminosae) and Cucurbitaceae, little has been revealed about their biological roles (Polacco and Holland 1993, Sirko and Brodzik 2000). Urease has been proposed to function coordinately with arginase in the utilization of seed protein reserves during germination (Thompson 1980). A second proposed role is the assimilation of urea derived from the ureide metabolism (Shelp and Ireland 1985) or imported from the environment since urea is an effective foliar fertilizer (Zonia et al. 1995).

The best studied urease derives from the jackbean (*Canavalia ensiformis*) which was crystallized by Sumner in 1926, representing the first crystals of a characterized enzyme. More recently we have described the presence of a family of urease-related genes in the jackbean (Pires-Alves et al. 2003) and characterized another isoform of the jackbean urease, named canatoxin (Carlini and Guimarães



1981; Follmer et al. 2001; 2004a). Urease activity was found in all tissues of soybean plants assayed (Polacco and Havir 1979, Das et al. 2002). Soybean produces two urease isoenzymes (Holland et al. 1987) that share 85% identity at the amino acid level. The embryo-specific urease, encoded by the *Eu1* gene, is synthesized only in the developing embryo (Polacco and Havir 1979, Torisky and Polacco 1990), while the so called “ubiquitous” urease, encoded by the *Eu4* gene was found in all tissues examined, namely cultured cells, leaves, embryos, roots and seed coats (Polacco and Winkler 1984, Polacco et al. 1985, Toriski et al. 1990). Although the ubiquitous urease is found in seeds at levels of 1/1000 to 1/100 of that of the embryo-specific urease, this is the isoenzyme responsible for recycling metabolically derived urea since mutants lacking this protein accumulate urea and have necrotic leaf tips associated with urea burn (Stebbins et al. 1991). It has been suggested that the embryo-specific urease does not play a urea assimilatory role and that it may be involved in seed chemical defense (Polacco and Holland 1993).

Our group has shown that plant and microbial ureases display several biological properties that are independent of their ureolytic activity, such as the activation of blood platelets, interaction with glycoconjugates and insecticidal activity (Follmer et al. 2001; 2004a; 2004b). Besides these activities, the jackbean canatoxin is also lethal to rats and mice by intraperitoneal route (Carlini and Guimarães 1981, Follmer et al. 2001) and inhibits the growth of phytopathogenic fungi (Oliveira et al. 1999). The entomotoxic effects of jackbean ureases and of the soybean embryo-specific urease persisted after treatment of the enzymes with an irreversible inhibitor of the ureolytic activity, demonstrating that other protein

domains, besides the active site, are involved (Follmer et al. 2004a; 2004b). An internal entomotoxic peptide released by insect cathepsins upon digestion is responsible for the insecticidal activity of canatoxin (Carlini et al. 1997; Ferreira-DaSilva et al. 2000). These findings reinforce the hypothesis that ureases might be involved in plant defense mechanisms (Carlini and Grossi-de-Sá 2002).

In the present work we have obtained genetically transformed tobacco plants harboring the full length cDNA of the soybean ubiquitous urease. Protein extracts from wild-type seeds and from leaves of transgenic plants were tested for their response against phytopathogenic fungi. Our results attest the fungicidal activity of soybean isoenzymes and suggest their potential use to confer resistance against phytopathogenic fungi in transgenic plants.

## Results

### Production of transgenic plants expressing the soybean ubiquitous urease gene

Twelve independently transformed tobacco plants harboring the full length cDNA encoding the soybean ubiquitous urease under the control of the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter and the nopaline synthase gene (*nos*) terminator were obtained after leaf disc transformation by *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch et al. 1985). The structure of the pGPTV-JIT vector T-DNA is illustrated in Figure 1. No distinguishable effects on plant growth and development were observed in either transgenic or non-transformed control plants, with identical general phenotypes seen throughout their life cycles.

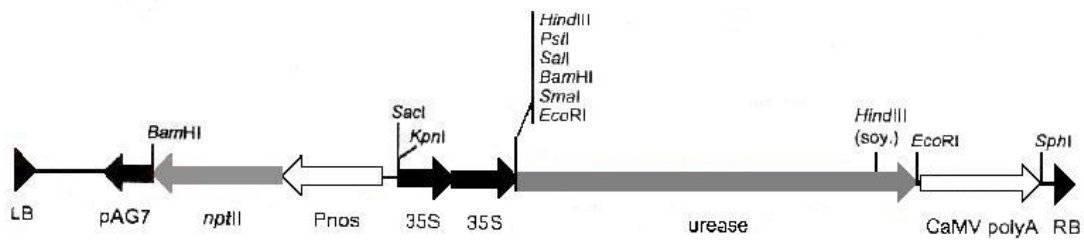


Figure 1. T-DNA Construct

T-region of the pGPTV-JIT-urease binary vector containing the cDNA of the soybean ubiquitous urease gene. LB: T-DNA left border; RB: T-DNA right border; Pnos: *nos* promoter; *nptII*: neomycin phosphotransferase II encoding gene (kanamycin selectable marker); 35S: Cauliflower Mosaic Virus leader sequence of 35S ribosomal RNA.

The urease transgene was confirmed in regenerated plants by PCR and Southern blot hybridization. Using genomic DNA from transgenic and non-transgenic tobacco leaves and primers specific for a 300 bp fragment of the soybean ubiquitous urease gene, a specific band of the exact length could be amplified by PCR only when DNA from transgenic plants was assayed (Figure 2). A similar band was observed when pGPTV-JIT DNA was used as template. Non-specific amplifications in the PCR analysis of non-transformed and transformed plants are probably derived from tobacco urease endogenous gene(s) since these fragments were not detected in the vector pGPTV-JIT harbouring the T-DNA (Figure 2).

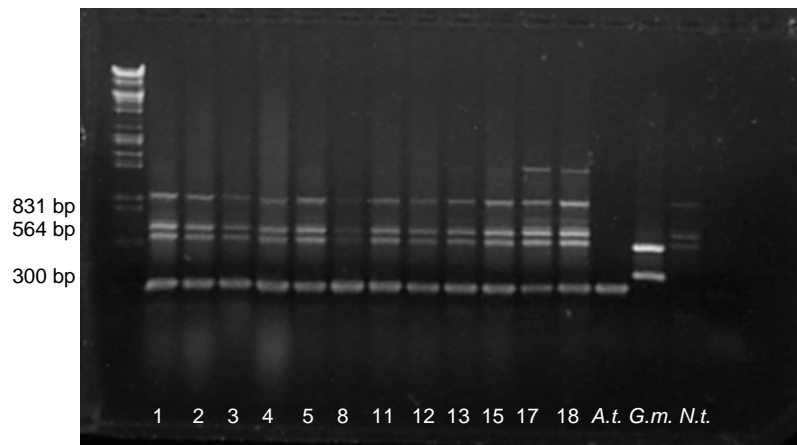


Figure 2. PCR Analysis

Agarose gel electrophoresis of PCR products using primers which amplify a fragment of 300 bp of the soybean ubiquitous urease gene and template DNA from twelve transgenic plants (1 – 18), vector pGPTV-JIT-urease harboring the T-DNA (A.t), *Glycine max* (G.m), and wild-type tobacco (N.t).

Southern blot analysis was conducted with the plant genomic DNA cleaved with *KpnI* (which cut the integrated gene in one site) and a 2,000 bp probe derived from the ubiquitous urease coding region. Results (not shown) demonstrated the presence of one up to three copies of integrated genes in all the transgenic plants.

#### Protein extraction and immunoblot analysis of the recombinant soybean urease

Crude protein extracts prepared from young leaves of transgenic plants were tested for urease activity and their immunoreactivity against anti-jackbean

urease antibodies. Controls consisted of non transformed plants and plants from the same variety transformed with the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) gene (Table 1). Protein content of the transgenic leaf extracts was  $2.76 \pm 0.06$  mg per g of fresh tissue while non-transformed leaves contained 3.0 mg per g. Leaf extracts from transgenic plants showed differences in the levels of ureolytic activity (Table 1).

Plant 1 showed a two-to-three-fold higher urease activity while the remaining transgenic plants exhibited urease activities slightly elevated or lower than that of the non-transgenic control plant (Table 1). For comparison, the specific activity of embryo-specific urease purified from wild-type seeds is around 22 U per mg of seed protein (Follmer et al. 2004a).

As previously described (Polacco and Havir 1979), soybean ureases cross react with jackbean ureases in immunoassays. Seven among the transgenic plants obtained showed five to fifty-fold higher levels of immunoreactivity of leaf extracts against anti-jackbean urease antibodies. The remaining plants analyzed showed values of immunoreactivity equivalent to the non-transformed control (Table 1).

Table 1. Analysis of Recombinant Urease in Leaf Protein Extracts from Transgenic Tobacco Plants

Plant	Urease Activity mU mg <sup>-1</sup> protein	Urease cross-reactive material μg urease mg <sup>-1</sup> protein
1	1.25 ± 0.43	0.50
2	0.66 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.50
3	0.28 ± 0.07 <sup>f</sup>	0.11
4	0.36 ± 0.15 <sup>d,e,f</sup>	0.02
5	0.43 ± 0.13 <sup>c,d</sup>	0.02
11	0.85 ± 0.17	0.23
12	0.41 ± 0.27 <sup>c,e</sup>	0.05
13	0.56 ± 0.09 <sup>a,b</sup>	1.00
15	0.65 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.50
17	0.81 ± 0.03	0.11
18	0.66 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.05
Control 1	0.51 ± 0.11 <sup>c,b</sup>	0.02
Control 2	0.29 ± 0.07 <sup>f</sup>	0.02

Leaf extracts were assayed for urease activity by the phenol-nitroprussiate method. One unit of urease was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol NH<sub>3</sub> min<sup>-1</sup> at 37 °C and pH 7.5. Control 1: non-transformed plants; Control 2: tobacco plants transformed with the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. Values are the mean ± SD of three determinations (in triplicate). Means followed by the same letter do not differ significantly ( $\alpha = 0.05$ ).

SDS-PAGE and Western blot analysis (Figure 3) of leaf extracts derived from transgenic plants demonstrated the presence of the 90 kDa subunit of the soybean ubiquitous urease. Immunoreactive aggregates were seen in leaf extracts of some transgenic plants as well as smaller mass bands probably corresponding to degradation products of the heterologous protein (Figure 3).

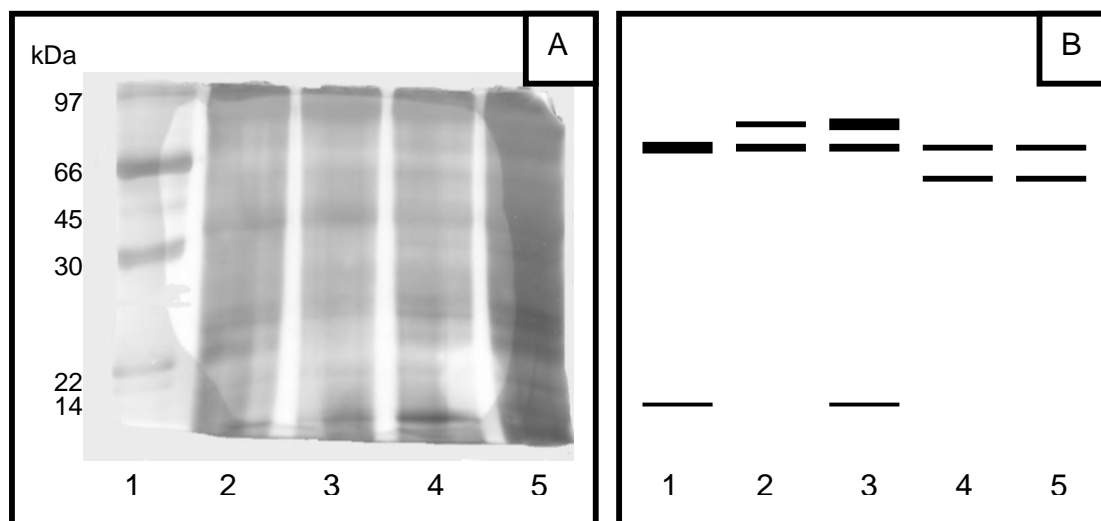


Figure 3. SDS-PAGE and Western blot

(A) SDS-10% PAGE of leaf protein extracts (150  $\mu$ g) from transgenic tobacco expressing the soybean ubiquitous urease. Protein bands were stained with Coomassie blue. Lanes: 1) molecular mass markers; 2) Plant 2; 3) Plant 3; 4) Plant 4; and 5) non-transformed Plant. (B) Representation of a Western blot of leaf protein extracts from transgenic tobacco expressing the soybean ubiquitous urease probed with anti-jackbean urease IgG. Lanes: 1) urease from *C. ensiformis*; 2) Plant 2; 3) Plant 3; 4) Plant 4 and 5) non-transformed Plant.

## Bioassays of recombinant soybean ubiquitous and wild-type embryo-specific ureases

The soybean embryo-specific urease (isolated from wild-type seeds) and leaf extracts prepared from transgenic tobacco plants expressing the ubiquitous urease were evaluated for their ability to inhibit fungal growth in gel plate assays. Results of fungal growth inhibition are summarized in Tables 2 and 3 and illustrated in Figure 4. The soybean seed urease (500  $\mu\text{g}$  per assay) inhibited the hyphal growth and/or sporulation and/or spore germination of *F. solani*, *Penicillium herguei*, *Curvularia lunata*, *Trichoderma* sp, *T. pseudokomingii* and *T. viride* (Table 2). On the other hand, protein extracts (240  $\mu\text{g}$  per assay) from leaves of Plants 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13 and 17 exhibited high levels of activity against *Penicillium* sp. Besides the inhibition of *Penicillium* sp growth, extracts of Plants 2 and 3 also inhibited *T. citrinoviride* while extracts of Plants 3, 4 and 5 inhibited *C. lunata* as strongly as ketoconazole (Table 3). None of the extracts inhibited the growth of *Rhizoctonia solani* or *Fusarium* sp. Leaf protein extracts from non-transformed tobacco plants were unable to inhibit the growth of any of the fungi tested. Figure 4 shows that the antifungal activity of 25 to 80 micrograms of seed urease protein or leaf extracts from Plant 3, is comparable to the effect of ketoconazole on the growth of *Penicillium herguei*.



Table 2. Inhibition of Fungal Growth by Soybean Seed Urease

Fungi	Antifungal activity	
	Hyphal growth	Germination of spores
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-
<i>Fusarium solani</i>	-	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	+	+
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	+	+
<i>Trichoderma viride</i>	+	+
<i>Penicillium</i> sp	-	-
<i>Penicillium herguei</i>	+	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-
<i>Curvularia lunata</i>	+	+
<i>Aspergillus glaucus</i>	-	-

Solutions of soybean seed urease (500 µg/assay) were applied onto disc papers for the assay of hypha growth inhibition or incubated with spore suspensions subsequently tested for germination. +: inhibition; -: no inhibition.

Table 3. Inhibition of Fungal Growth by Leaf Extracts from Tobacco Plants Transgenic for Soybean Ubiquitous Urease

	<i>R. solani</i>	<i>T. citrinoviride</i>	<i>C. lunata</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicilium</i> sp.
Plant 1	ND	ND	ND	ND	+
Plant 2	ND	++	ND	ND	++
Plant 3	ND	+++	++++	ND	+
Plant 4	ND	ND	++	ND	+++
Plant 5	ND	ND	++	ND	++
Plant 11	ND	ND	ND	ND	++
Plant 12	ND	ND	ND	ND	++
Plant 13	ND	ND	ND	ND	+++
Plant 15	ND	ND	ND	ND	ND
Plant 17	ND	ND	ND	ND	++
Plant 18	ND	ND	ND	ND	ND
Control plant	ND	ND	ND	ND	ND
Buffer	ND	ND	ND	ND	ND
Ketoconazole	+++++	+++++	+++	ND	++++

A well diffusion assay was used. Wells of 7 mm (diameter) were cut out, 80  $\mu$ L of leaf extracts (240  $\mu$ g of protein) from transgenic and non-transgenic plants were incubated with  $10^6$  spores/100  $\mu$ L of each fungus or 5 mm of mycelial mass and tested. Control dishes contained fungi alone with buffer (80  $\mu$ L) (negative controls) or ketoconazole (80  $\mu$ L – 10  $\mu$ g/mL - positive control). Inhibition of fungal growth was measured after 4 days at 28  $^{\circ}$ C. ND: not detected; +: 1.0 cm – 1.5 cm of inhibition; ++: 1.5 – 2.0 cm; +++: 2.0 – 2.5 cm; ++++: 2.5 – 5.0 cm; +++++: 5.0 cm or more.

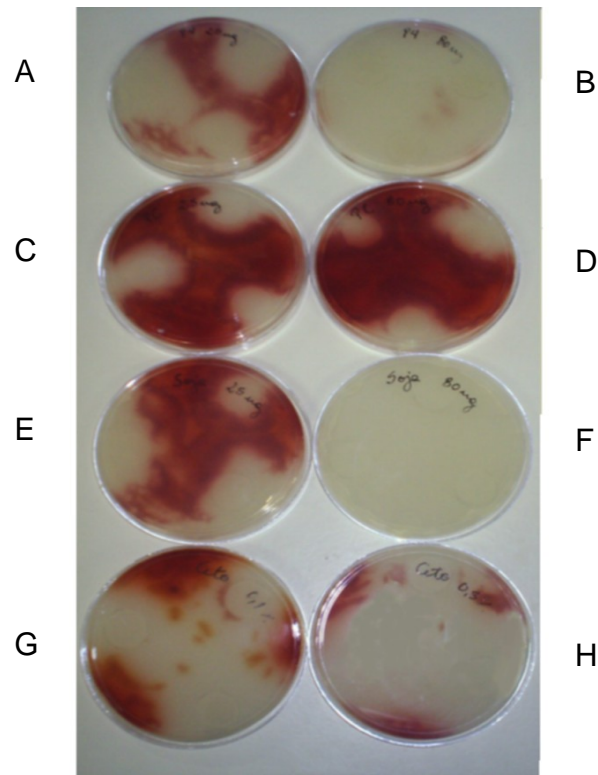


Figure 4: Antifungal activity of soybean ureases against *P. herqueii*.

Seed soybean urease and leaf extract of transgenic tobacco expressing ubiquitous soybean urease were tested in a paper disc assay for inhibition of growth of *P. herqueii*. Fungal growth is depicted as the redish mycelial mass against the whitish PDA gel. A, C, E: 25  $\mu$ g protein of leaf extract from Plant 3, non-transformed plant, and soybean seed urease, respectively. B, D, F: 80  $\mu$ g protein of leaf extract from Plant 3, non-transformed plant, soybean seed urease, respectively. G and H: ketoconazole 0.1 and 0.5 %, respectively.

## Discussion

Oliveira et al. 1999 have previously described the antifungal activity of canatoxin, an isoform of the jackbean urease. Similarly, in this work we showed that soybean ureases are also able to inhibit the growth and/or germination of phytopathogenic fungi. These results were obtained by testing the antifungal activity of the soybean embryo-specific enzyme isolated from wild-type seeds and leaf protein extracts from transgenic tobacco plants expressing the soybean ubiquitous enzyme.

Brodzik et al. 2000 have previously transformed tobacco plants with *Helicobacter pylori ureA* and *ureB* structural genes, each gene coding for a subunit of the bacterial urease. These authors reported no differences in the growth characteristics of the transformed plants, which showed up to two-fold increase in urease activity. An important conclusion drawn by these authors was that tobacco-native accessory proteins for nickel insertion were able to post-transcriptionally activate the bacterial recombinant enzyme (Brodzik et al. 2000). These authors did not test the transgenic plants for their resistance to insects or phytopathogens (Brodzik et al. 2000). Among the transgenic tobacco plants we obtained, only one plant exhibited more than two-fold increase in urease activity as compared to control plants. However increased content of urease cross-reactive material was found in leaf extracts of nine transgenic plants (Table 1) and the presence of the 90 kDa subunit of soybean ubiquitous urease was detected by Western blot. The total protein content of the transgenic leaves did not differ significantly. There was no clear correlation between the levels of urease activity and the number of inserted gene copies or the content of urease cross-reactive material in the transgenic

plants. This discrepancy is probably due to aggregation and/or a partial degradation of the heterologous protein that could affect the recognition by anti-urease antibodies (Figure 3) and/or to a deficiency in nickel insertion yielding an inactive apourease, suggesting that, although tobacco is much closer to soybean than *H. pylori*, in some cases there was still incomplete activation of the expressed apoenzyme.

Despite their highly conserved structures and similar mechanism of catalytic action, little is known about the physiological role of ureases, especially in plants. A perception shared by many is that urease plays no major role in plants because its substrate, urea, is not a major plant metabolite. Urea is an excretory form of excess nitrogen in animals and plants do not excrete nitrogen (Polacco and Holland 1993). Witte et al. 2002 showed that the reduction of leaf urease activity in potato does not influence nitrogen distribution and losses.

Nevertheless the distribution of ureases in leguminous seeds as well as the accumulation pattern of the protein during seed maturation is suggestive of an important physiological role. Canatoxin, an isoform of the jackbean urease first isolated as a highly toxic protein (Carlini and Guimarães 1981), was previously shown to inhibit the growth of the phytopathogenic fungi *Macrophammina phaseolina*, *Sclerotium rofstii* and *Colletotrichum gloesporioides* using 1 mg of the purified protein in a disc plate diffusion assay (Oliveira et al. 1999) equivalent to the one used in the present work. It is not known if the enzymatic activity of jackbean ureases is important for their antifungal properties. Here we described similar properties for the two soybean isoenzymes, both active at much lower doses in the disc method assay (80µg of embryo-specific urease or of leaf protein containing

the recombinant ubiquitous urease, Figure 4). At this point, it can not be ruled out that other components in the crude extracts of tobacco leaf expressing the ubiquitous urease acted synergistically to attain the high levels of antifungal activity observed. Moreover our data show that inhibition of fungal growth by the recombinant ubiquitous urease correlated more strongly with the level of urease cross-reactive material, which may include the apourease, as well as aggregates and degradation products, than to the active holoenzyme, which is an indication that this property is probably not related to the enzymatic activity.

Both jackbean urease isoforms (Carlini et al. 1997, Follmer et al. 2004a) and the soybean embryo-specific urease present entomotoxic activity (Follmer et al. 2004b). There is no correlation between the insecticidal and enzymatic activities of these proteins since they keep the entomotoxic properties after treatment with *p*-hydroxymercurybenzoate, clearly indicating that this feature is independent of ureolytic activity (Follmer et al. 2004a; 2004b).

These newly described properties of plant ureases may shed a new light on the physiological roles of these proteins. The data we present here further reinforce the possibility of a protective role of plant ureases also against phytopathogenic fungi besides herbivores.

## Material and Methods

### Plant Transformation

Plasmid pGPTV-JIT-urease was kindly provided by Dr. Mark Taylor from the Scottish Crop Research Institute, Dundee, Scotland. T-DNA structure is shown in

Figure 1. This plasmid was transferred to *A. tumefaciens* LBA4404 cells by triparental matting (Peach and Velten 1994) and *Nicotiana tabacum* var. Turkish was transformed by the leaf disc method (Horsch et al. 1985). Control plants consisted of non-transformed *N. tabacum* and transformed plants with the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) gene.

#### PCR analysis

Polymerase chain reactions (PCR) were performed using genomic DNA extracted from leaves of primary transformants and control plants by the CTAB method described by Doyle and Doyle (1987) and quantified spectrophotometrically. Reactions employed specific primers to the soybean ubiquitous urease (GenBank accession number AY230156) gene coding sequence, GmUre1For (5'-GGTGAAGATGAGGCCTATG-3') and GmUre1Rev (5'-CTTAAAAGAGGAAGTAATTT-3'). PCR components were as follows: 200 ng of each primer, 1 U Taq DNA polymerase (Biotools B&M Labs, S.A. - Spain), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, and 200 ng genomic DNA. A Gene Amp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) was programmed with an initial denaturation step at 96 °C for 2 min followed by 35 cycles of 96 °C for 1 min, 47 °C for 1 min and 72 °C for 1.5 min, and a final extension step of 72 °C for 5 min. PCR products were separated and analyzed by agarose gel electrophoresis (Figure 2).

### Southern blot hybridization

Genomic DNA was prepared from leaf tissues and quantified as described above. DNA samples (20 µg) were cleaved with *KpnI* and electrophoretically separated on a 1% agarose gel. A fragment of 2 kb from the soybean ubiquitous urease cDNA was excised from pGPTV-JIT-urease by *HindIII* and used as probe. Probe labeling was carried out as specified in the Ready-to-go-DNA labeling beads (dCTP) (Amersham Biosciences), hybridization, stringency washes and detection were carried out as described by Memelink et al. 1994.

### Embryo-specific soybean urease

Embryo-specific urease was isolated from a commercial variety of soybeans according to Follmer et al. 2004b, except for the last step in the purification protocol, which consist of an immobilized metal affinity chromatography, aimed to separate urease isoforms. According to Holland et al. 1987, the content of the ubiquitous urease in soybean seeds is about 1/100 to 1/1000 of that of the embryo-specific enzyme.

### Leaf protein crude extracts

Fresh tobacco leaves from 2-month old transgenic and control plants were frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar into powder. Leaf powder was homogenized in three volumes (v/w) of 10 mM sodium phosphate (NaPB) buffer pH 7.5 containing 5 mM β-mercaptoethanol and kept under stirring at 4 °C for 2 h.



After centrifugation at 12,000 rpm for 10 min, the pellet was removed and protein content was determined by the method of Bradford (1976) using BSA as standard.

#### SDS-PAGE

Polyacrylamide gels (10%) containing 0.1% SDS were prepared as described (Laemmli 1970). Samples of leaf protein (150 µg) were electrophoretically resolved at 35 mA for 4 h at room temperature. Protein bands were stained with Coomassie blue. Molecular mass markers used were LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Biosciences).

#### Dot blot and Western blot

Protein samples (5 µg to 8 ng - serially diluted) were applied onto nitrocellulose membranes (Sigma Chem Co) by micropipetting. Protein bands were transferred by gravity from the SDS-PAGE 10% gels onto 0.45 µm PVDF filters (Hybond-P, GE Amersham Biosciences). The membranes were then incubated with anti-jackbean urease IgG developed in rabbits (Follmer et al. 2001) as the primary antibody, then exposed to anti-rabbit IgG (whole molecule) antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma Chem Co) and revealed with nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma Chem Co).

#### Urease activity

Fifty µL aliquots of urea solution (100 mM) were mixed with protein samples and buffered with 20 mM NaPB pH 7.5 to give a final volume of 500 µL. Reaction

mixtures were incubated for 120 min at 37 °C and the ammonia released was measured colorimetrically (Weatherburn 1967). One unit of urease activity was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu\text{mol NH}_3 \text{ min}^{-1}$  at 37 °C and pH 7.5 under the conditions described.

#### Antifungal activity

(1) A well-diffusion assay was employed to assess the antifungal activities of the transgenic leaf protein extract. Twenty mL of molten Agar Czapeck was poured into sterile Petri dishes and allowed to harden. Wells of 7 mm in diameter were cut out from the center of these agar plates and 80  $\mu\text{L}$  of leaf crude extracts (240  $\mu\text{g}$  of protein in 10 mM NaPB and 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7.5) were placed into each well (Simonetta *et al.*, 1997). The plates were maintained at 4°C for 48 h. The fungi used in the assays included *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma citrinoviride*, *Aspergillus glaucus*, *Curvularia lunata* and *Fusarium* sp. One hundred  $\mu\text{L}$  of a suspension of about  $10^6$  spores or 5 mm of mycelial mass from the fungi were placed onto each Petri dish. Controls included dishes with fungi and buffer (80  $\mu\text{L}$ , negative controls) or fungi and ketoconazole (80  $\mu\text{L}$  at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , positive control) carried out in parallel. The plates were incubated at 28 °C and inhibition zones were measured.

(2) Spores ( $10^6/100 \mu\text{L}$ ) of *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Trichoderma* sp., *T. pseudokoningii*, *T. viride*, *Penicillium* sp., *P. herguei*, *C. gloeosporioides*, *C.*

*lunata*, *A. glaucus* were inoculated onto Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA). About 40  $\mu\text{L}$  of protein solutions (12.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in 20 mM NaPB, 1 mM EDTA and 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7.5) was loaded onto sterile filter paper discs (Whatman 3MM) and placed on the previously inoculated agar. The Petri dishes were inverted and then incubated at 28  $^{\circ}\text{C}$ . A zone of inhibition of fungal growth could be observed around the paper disc if the solution being tested showed any antifungal property.

(3) A suspension of about  $10^6$  spores was incubated with 40  $\mu\text{L}$  of protein solutions (12.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) during 2 h, and then inoculated onto Petri dishes containing PDA. Inhibition of fungal growth could be observed if the solution being tested showed any antifungal property.

#### Statistical analysis

The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the significance of differences among means was determined by the Turkey test.

#### Acknowledgments

This work was supported by MCT-CNPq-PRONEX (Programa de Apoio de Núcleos de Excelência), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PROCAD (Programa Nacional de Cooperação Acadêmica) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The

authors wish to thank Dr Mark Taylor from the Scottish Crop Research Institute, Dundee, Scotland, for kindly providing the pGPTV-JIT plasmid.

## References

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Brodzik, R., Koprowski, H., Yusibov, V. and Sirko, A. (2000). Production of urease from *Helicobacter pylori* in transgenic tobacco plants. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 5, 357-366.

Carlini, C. R. and Guimarães, J. A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon.* 19, 667-675.

Carlini, C. R., Oliveira, A. E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M. A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90, 340-348.

Carlini, C. R. and Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon.* 40, 1515-1539.

Das, N., Kayastha, A. M., and Srivastava, P. K. (2002). Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) seeds. *Phytochemistry* 61, 513-521.

Dixon, N. E., Gazzola, C., Watters, J. J., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1975). Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. *J.Amer.Chem.Soc.* 97, 4130-4131.

Doyle, J. J., and Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull* 19, 11-15.

Ferreira-DaSilva, C. T., Bombarovits, M. E., Masuda, H., liveira, C. M., Carlini, C. R. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 162-171.

Follmer, C., Barcellos, G. B. S., Zingali, R. B., Machado, O. L. T., Alves, E. W., Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J. G., Carlini, C. R. (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack bean (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 360, 217-224.

Follmer, C., Wassermann, G. E., Carlini, C. R. (2004a). Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science.* 167, 241-246.

Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G. E., Oliveira-Severo, D., Carlini, C. R. (2004b). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases. Biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271, 1357-1363.

Holland, M. A., Griffin, J. D., Meyerbothling, L. E., and Polacco, J. C. (1987). Developmental Genetics of the Soybean Urease Isozymes. *Developmental Genetics* 8, 375-387.

Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eicholtz, D., Rogers, S. G., Fraley, T. A. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Memelink, J., Swords, K. M. M., Staehelin, L. A., and Hoge, J. H. (1994). Southern, Northern and Western blot analysis. In: Gelvin SB and Schilperoot RA (eds), *Plant Molecular Biology Manual*. (pp. F1/1-23) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Mobley, H. L. and Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiology Reviews* 53, 85-108.

Mobley, H. L., Island, M. D., and Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol.Rev.* 59, 451-480.

Oliveira A. E., Gomes V. M., Sales M. P., Fernandes K. V., Carlini C. R., and Xavier-Filho J. (1999). The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Rev. Brasil. Biol.* 59, 59-62.

Peach, C. R. W. and Velten, J. (1994). *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: Gelvin SB and Schilperoort RA (eds), *Plant Molecular Biology Manual*. (pp. B1/1-19) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Pires-Alves, M., Grossi-de-Sá, M. F., Barcellos, G. B. S., Carlini, C.R., Moraes, M.G., 2003. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol.* 44, 139-145.

Polacco, J. C. and Havir, E. A. (1979). Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *The Journal of Biological Chemistry* 254, 1707-1715.

Polacco, J. C. and Winkler, R. G. (1984). Soybean leaf urease: a seed enzyme ? *Plant Physiology* 74, 800-803.

Polacco, J. C., Krueger, R. W., and Winkler, R. G. (1985). Structure and possible ureide degrading function of the ubiquitous urease of soybean. *Plant Physiology* 79, 794-800.

Polacco, J. C. and Holland, M. A. (1993). Roles of Urease in Plant Cells. *International Rev.Cytology* 145, 65-103.

Shelp, B. J. and Ireland, R. J. (1985). Ureide Metabolism in Leaves of Nitrogen-Fixing Soybean Plants. *Plant Physiology* 77, 779-783.

Simonetta, A. C., deVelasco, L. G. M., and Frison, L. N. (1997). Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Letters in Applied Microbiology* 24, 139-143.

Sirko, A. and Brodzik, R. (2000). Plants ureases: roles and regulation. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1189-1195.

Stebbins, N., Holland, M. A., Cianzio, S. R., and Polacco, J. C. (1991). Genetic Tests of the Roles of the Embryonic Ureases of Soybean. *Plant Physiology* 97, 1004-1010.

Sumner, J. B. (1926). The isolation and crystallization of the enzyme urease. *The Journal of Biological Chemistry* 69, 435-441.

Thompson, J. F. (1980). In "The Biochemistry of Plants". B. J. Mifflin (eds) Vol 5, (pp 375-402). Academic Press, New York, USA.

Torisky, R. S. and Polacco, J. C. (1990). Soybean roots retain the seed urease isoenzyme synthesized during embryo development. *Plant Physiology* 94, 681-689.

Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, 971-974.



Witte, C. P., Tiller, S. A., Taylor, M. A., and Davies, H. V. (2002). Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of N-15 after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiology* 128, 1129-1136.

Zonia, L. E., Stebbins, N. E., and Polacco, J. C. (1995). Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiology* 107, 1097-1103.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo foi iniciado visando a clonagem dos genes codificadores das ureases presentes em soja. Partindo de iniciadores (*primers*) definidos em regiões de identidade total entre as ureases vegetais conhecidas, cujas seqüências estavam disponíveis no GenBank, esperávamos obter os clones para as duas proteínas. Com a estratégia utilizada obtivemos um fragmento parcial de aproximadamente 300 pb. O seqüenciamento deste fragmento revelou homologia de 99 % com ureases vegetais.

Utilizando o fragmento de 300 pb como sonda, pudemos demonstrar, por hibridizações Southern *blot*, que a família de genes de urease em soja apresenta 2 membros, reiterando dados descritos anteriormente, de que as ureases presentes em soja são codificadas por dois genes: *Eu1* para a urease embrião-específica e *Eu4* para a urease ubíqua (MEYER-BOTHLING & POLACCO, 1987; POLACCO *et al.*, 1989).

Decidimos interromper as tentativas de clonagem de um cDNA completo de urease a partir do fragmento de 300 pb já obtido, quando tornaram-se disponíveis no GenBank (Novembro/2002) as seqüências de dois genes de soja, depositadas quase simultaneamente por pesquisadores de dois grupos diferentes. O grupo da Escócia, liderado pelo Dr. Mark Taylor obteve a seqüência completa do cDNA da urease ubíqua, enquanto a equipe do Dr. Joseph C. Polacco, do EUA, depositou a seqüência da urease embrião-específica.

Ao contrário da urease ubíqua de soja, a urease embrião-específica é facilmente purificada de sementes de soja com bom rendimento, por metodologia clássica. Com a proteína purificada a partir da semente, nosso laboratório

demonstrou a atividade inseticida da urease embrião-específica, que é comparável a descrita para as ureases de *C. ensiformis* (FOLLMER *et al.*, 2004). Resultados preliminares foram obtidos indicando que a urease embrião-específica de soja também apresentava propriedades antifúngicas (BECKER-RITT *et al.*, submetido). A dúvida sobre o fato da urease ubíqua compartilhar destas propriedades biológicas dificilmente seria respondida purificando-se essa isoforma da proteína diretamente da planta, em função da sua baixa concentração nos tecidos da soja. Assim, uma vez que dispúnhamos do plasmídeo pGPTV-JIT armado com o cDNA completo da urease ubíqua de soja, gentilmente cedido pelo Dr. Mark Taylor, decidimos pela transformação direta de plantas de tabaco com esse transgene como uma forma de produção dessa isoforma pouco abundante da urease de soja. Além da possibilidade de isolar a proteína recombinante a partir de extratos da planta para testes *in vitro*, poderíamos ainda avaliar o fenótipo das plantas transgênicas e conduzir alguns bioensaios *in planta*.

Um dos problemas com a produção de urease em um sistema heterólogo é a incorporação de níquel na apoenzima. Na ausência de níquel, a apourease não apresenta atividade ureolítica, sendo incapaz de incorporar o metal diretamente do ambiente. Nos organismos produtores de urease, esse é um processo energia-dependente, mediado por 3 a 4 proteínas acessórias, cujos genes em bactérias formam um operon juntamente com os genes estruturais das subunidades da urease bacteriana (SCOTT *et al.*, 1990). Essas proteínas acessórias apresentam uma certa espécie-especificidade. Por exemplo, as proteínas acessórias de soja não incorporam níquel na apourease do fungo *Schizosaccharomyces pombe* (BACANAMWO *et al.*, 2002).

Neste trabalho, plantas transgênicas de tabaco expressando o gene da urease ubíqua de soja foram geradas pelo método de transformação genética por *A. tumefaciens*. A presença do transgene nos tecidos das plantas foi confirmada por PCR. A escolha do tabaco como a planta a ser transformada com o plasmídeo pGPTV-JIT foi motivada por três motivos principais: (a) o tabaco é uma planta modelo de fácil manipulação, com protocolos de transformação muito bem definidos; (b) o grupo de Sirko, em 2001, obteve plantas de tabaco transgênicas para a urease da bactéria *Helicobacter pylori*, demonstrando que as proteínas acessórias do tabaco podiam complementar a enzima bacteriana; (c) a massa foliar de tabaco é muito maior do que a de *Arabidopsis thaliana*, permitindo a purificação da proteína recombinante em maior quantidade.

O conteúdo total de proteínas, nas folhas das plantas transformadas não diferiu significativamente das plantas-controle. A discrepância entre os níveis de atividade ureásica e o conteúdo do material imunorreativo deveu-se, provavelmente, à agregação das proteínas recombinantes ou à uma degradação parcial de proteínas em algumas plantas ou, ainda, à deficiência na inserção de níquel e ativação da apourease, sugerindo que, apesar de tabaco estar muito mais próximo à soja do que *H. pylori*, em alguns casos a ativação da apoenzima pode ser incompleta.

*Southern blots* preliminares indicaram que o número de cópias dos transgenes variou de 1 a 3 nos genomas das plantas transformadas (resultados não apresentados). No entanto, não houve correlação direta entre o número de cópias inseridas e o nível de atividade ureolítica encontrado para as plantas transgênicas.

A grande variabilidade em atividade ureásica e imunorreatividade encontrada entre as plantas transgênicas também pode ser explicada pela baixa especificidade e pela falta de uniformidade do processo de integração do T-DNA no genoma da célula vegetal, ocorrendo de maneira aleatória e em um número indefinido de locais, sendo possível a integração do transgene na forma de repetições em *tandem*, embora esta seja mais comumente descrita para os protocolos de transformação genética envolvendo biobalística, eletroporação e microinjeção (DE LA RIVA *et al.*, 1998; KUMAR & FLADUNG, 2001). A necessidade de ocorrência de um pareamento mínimo entre a fita-T e as seqüências-alvo genômicas permite que cópias do T-DNA sejam integradas com igual probabilidade em regiões altamente transcritas do DNA nuclear, garantindo elevada transcrição do transgene, como em regiões de heterocromatina constitutiva, inacessível à maquinaria de transcrição durante a maior parte do ciclo celular, resultando em um baixo nível de expressão do transgene. A variação de expressão do transgene neste caso é dita decorrente de efeito de posição (GELVIN, 1998; FU *et al.*, 2000; KUMAR & FLADUNG, 2001).

Além do local de integração, outros fenômenos também interferem na expressão do transgene como o silenciamento transcricional, o silenciamento pós-transcricional, a inativação em *trans* e a co-supressão (FINNEGAN & McELROY, 1994; GRANT, 1999; MEYER, 1999). Estes mecanismos representam um sistema de defesa para a detecção e inativação de DNAs invasivos, como transgenes, transposons e vírus, que poderiam comprometer a viabilidade de células que expressam elevados níveis de proteínas e mRNAs associados a estes elementos exógenos (MATZKE & MATZKE, 1998; FU *et al.*, 2000).

Anteriormente, foi descrito que a CNTX, uma isoforma da urease do feijão-de-porco, é capaz de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos como: *Macrophammina phaseolina*, *Sclerotium rofstii* e *Colletotrichum gloesporioides*, usando-se 1 mg da proteína em ensaio de difusão em placa (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Neste trabalho, descrevemos propriedades similares para as duas isoenzimas de soja, ambas ativas em baixas doses no ensaio de difusão em disco (80 µg da urease embrião-específica e 80 µg do extrato de folhas contendo a urease ubíqua). Não é possível descartar totalmente que outros componentes, presentes nos extratos das folhas de tabaco contendo a urease ubíqua, possam estar atuando sinergisticamente, para conferir os altos níveis da atividade antifúngica observado nos extratos. Resultados preliminares (não mostrados) sugerem que plantas de tabaco transgênicas para a urease ubíqua de soja desafiadas, *in vivo*, com o fungo *Penicillium* sp apresentariam uma resistência aumentada para a infecção.

Nossos dados indicam que a inibição do crescimento de fungos pela urease ubíqua recombinante correlaciona-se mais diretamente com os níveis de material imunorreativo, os quais podem incluir agregados e produtos de degradação, do que com a holoenzima ativa, o que é uma indicação que esta propriedade provavelmente não esteja relacionada com a atividade enzimática. O mecanismo de ação antifúngica das ureases de soja e da *C. ensiformis* não é conhecido. Os efeitos observados foram a inibição do crescimento das hifas, a inibição da esporulação e a inibição da germinação de esporos. SAIDO-SAKANAKA e colaboradores em 2004, sintetizaram um peptídeo baseado no sítio ativo de

defensinas de insetos e demonstraram que esse peptídeo, numa concentração de 15 µg/mL, é capaz de inibir totalmente a germinação de esporos do fungo *Tricophyton mentagophytes*. É interessante notar que nem todos os fungos foram sensíveis, em particular, *Fusarium oxysporum* mostrou-se resistente aos efeitos da CNTX de *C. ensiformis* (OLIVEIRA *et al.*, 1999), enquanto os fungos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp foram insensíveis para ambas as isoformas de urease de soja. (este trabalho)

Ambas as isoformas de urease do feijão-de-porco (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DaSILVA *et al.*, 2000; FOLLMER *et al.*, 2004a; 2004b) e também a urease embrião-específica da soja (FOLLMER *et al.*, 2004a) apresentam atividade entomotóxica. No presente trabalho, não foi possível testar se as plantas de tabaco transgênicas para a urease ubíqua de soja apresentam semelhante resistência aumentada ao ataque de insetos fitófagos. Os principais insetos pragas da cultura do tabaco são, principalmente, lepidópteros (*Manduca sexta*, *Heliothis virescens*), que não são afetados pela ingestão de urease, uma vez que são incapazes de liberar o peptídeo entomotóxico (CARLINI *et al.*, 1997). Infelizmente, nesse trabalho, não foi possível testar pulgões ou *Trips tabaci*, que seriam potencialmente susceptíveis às ureases, para bioensaios.

Em suma, a descoberta de que ureases vegetais apresentam propriedades antifúngicas pode contribuir para a elucidação da função fisiológica dessas proteínas em vegetais. Esses resultados reforçam também o potencial biotecnológico dessas proteínas para o desenvolvimento de plantas transgênicas

que possam ter resistência aumentada contra o ataque de fungos fitopatogênicos além de insetos herbívoros.



## 6. CONCLUSÕES

- Confirmamos, que a família de genes de urease, em soja, apresenta dois membros;
- Plantas transgênicas de tabaco capazes de expressar a urease ubíqua de soja foram obtidas;
- Confirmamos, por PCR, Western blot e atividade ureásica, a presença do transgene e da proteína recombinante nas plantas transformadas;
- Descrevemos a capacidade de ambas as isoformas de urease de soja em inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos;

## 7. PERSPECTIVAS

- Expressar em sistema heterólogo a região do cDNA que corresponde às ureases ubíqua e embrião-específica inteiras, bem como peptídeos dela derivados, e demonstrar sua toxicidade em fungos e/ou insetos-praga modelos;
  
- Modificar alguns resíduos das ureases e/ou peptídeos derivados buscando-se identificar alguns aspectos estruturais importantes destas proteínas e relacioná-los com suas propriedades biológicas;
  
- Avaliar e comparar as seguintes atividades biológicas, tanto nas proteínas inteiras quanto nos peptídeos derivados:
  - atividade ureolítica,
  - atividade inseticida,
  - agregação plaquetária,
  - imunorreatividade,
  - inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos.
  
- Isolar, a partir de bibliotecas genômicas ou PCR, as seqüências genômicas completas das ureases de soja, de forma a caracterizar suas regiões promotoras e a regulação gênica determinada pelas mesmas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrews, R.E., Faust, R.M., Wabiko, H., Raymond, K.C., Bulla, L.A. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Critical Review Biotechnology*, 6, 163-232, 1987.

Armour, J.C.; Perera, R.L.C.; Bucham, W.C. & Grant, G. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. *Journal of Science and Food Agriculture*, 78: 225-231, 1998.

Bacanamwo, M., Witte, C.-P., Lubbers, M.W. and Polacco, J.C. Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. *Molecular Genetic Genomics*, 268, 525-534, 2002.

Barcellos, G.B.S., Almeida, L.M., Moreira, R.A., Cavada, B.S., Oliveira, J.T.A., Carlini, C.R. Canatoxin-cacanavalin A- and canavalin-cross-reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* (Mart) seeds. *Planta*, 189, 397-402, 1993.

Barja-Fidalgo, T.C., Guimarães, J.A. and Carlini, C.R. Lipoxigenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*, 29, 453-459, 1991.

Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A.H.S., Mitidieri, S., Fiuza, L.M., Carlini, C.R. and Pasquali, G. Expression of soybean (*Glycine max* (L) Merrill) ubiquitous urease in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and antifungal activity of soybean ureases. *Plant and Cell Physiology*, 2005. Submetido.

Betz, F.S., Hammond, B.G. & Fuchs, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32: 156-173, 2000.

Birch, A.N.E., Geoghegan, I.E., Majerus, M.E.N., Mcnicol, J.W., Hackett, C.A., Gatehouse, A.M.R. & Gatehouse, J.A. Tri-trophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. *Molecular Breeding*, 5: 75-83, 1999.

Botella, M. A., Y. Xu, T. N. Prabha, Y. Zhao, M. L. Narasimhan, K. A. Wilson, S. S. Nielsen, R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 112:1201-1210, 1996.

Bowles, D.B. Defense-related proteins in higher plants. *Annual. Review of Biochemistry*, 59: 873-907, 1990.

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

Bressani R, Elias L G. Nutritional value of legume crops for humans and animals. *Advances in Legume Science*. Summerfield R J e Bunting A M eds., Botanic Royal Gardens, Kew, 135-155, 1980.

Britto, R.O.; Lopes, A.R.; Parra, J. R. P.; Terra, W .R. & Silva-Filho, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Physiol*, 128 (B): 365-375, 2001.

Brodzik, R., Koprowski, H., Yusibov, V. and Sirko, A. Production of urease from *Helicobacter pylori* in transgenic tobacco plants. *Cellular and Molecular Biology Letter* 5, 357-366, 2000.

Bryant, M.P. Bacterial species of the rumen. *Bacteriology Review*, 23, 125-153, 1959.

Caldwell, R.A. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 43, 1992.

Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P. and Ary, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and  $\alpha$ -amylases from midgut of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92B(1):51-57, 1989.

Carlini C R, Guimarães J A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19, 667-676, 1981.

Carlini C R, Gomes C, Guimarães J A, Markus R P, Sato H, Trolin G. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacological and Toxicol.* 54, 161-166, 1984.

Carlini, C.R., Guimarães, J.A. and Ribeiro, J.M.C. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsionant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 84, 551-560, 1985.

Carlini C R, Barcellos G B S, Baeta-Neves A D V, Guimarães J A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins from leguminous seeds. *Phytochemistry*, 27, 25-30, 1988.

Carlini C R, Guimarães J A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon*, 29, 791-806, 1991.

Carlini, C.R., Oliveira, A.E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J. and Wells, M.A. Biological effects of canatoxin, a plant toxic protein, in different insect models. Evidence for proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *Journal of Economical Entomology*, 90:340-348, 1997.

Carlini, C.R. and Udedibie, A.B.I. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 4372-4377, 1997.

Carlini, C. R. and Grossi-de-Sá, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*. 40, 1515-1539, 2002.

Carriere, Y.; Ellerskirk, C.; Sisterson, M.; Antilla, L.; Whitlow, M.; Dennehy, T.J.; and Tabashnik, B.E. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus*

*thuringiensis* cotton. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 18: 1529-1523, 2003.

Chen, P., Rose, J., Love, R., Wei, C.H. and Wang, B.C. Reactive sites of na anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 1992.

Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3, 1-9, 1991.

Costa, J. A ; *Cultura da Soja*, 1<sup>a</sup> Edição. Editores: Ivo Manica e José Antonio Costa, 1996

Das, N., Kayastha, A. M., and Srivastava, P. K. Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) seeds. *Phytochemistry*, 61, 513-521, 2002.

De La Riva, G.A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R. & Ayra-Pardo, C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Elect Journal Biotechnology*, 1: 1-16, 1998.



Dhingra, O.D. & Acuña, R.S. Patologia da semente de soja. Editora UFV, 119 págs, 1997.

Dhingra, O.D., Sedyama, T., Carraro, I.M. & Reis, M.S. Behavior of four soybean cultivars to seed-infecting fungi in delayed harvest. *Fitopatologia Brasileira*, 3: 277-282, 1978.

Dixon, N. E., C. Gazzola, R. L. Blakeley, and B. Zerner. Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. *Journal of America Chemistry Socitel*, 97:4130-4131, 1975.

Doyle, J. J., and Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*, 19: 11-15, 1987.

Down, R.E., Ford, L., Woodhouse, S.D., Raemaekers, R.J.M., Leitch, B., Gatehouse, J.A. & Gatehouse, A.M.R. Snowdrop lectin (GNA) has no acute toxic effects on a beneficial insect predator, the 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.). *J. Insect Physiology*, 46: 379-391, 2000.

Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, E.C., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44, 162-171, 2000.

Ferreira-DaSilva, C.T., Efeitos da canatoxina e peptídeos derivados sobre diferentes insetos: uma proposta de bioinseticida. Tese de doutorado, UFRGS, Brasil, 2002.

Finnegan, J. & McElroy, D. Transgene inactivation: plants fight back! *BioTechnology*, 12: 883-888, 1994.

Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.G., Carlini, C.R. Canatoxin, a toxic protein from jack bean (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal*, 360, 217-224, 2001.

Follmer, C., Wassermann, G. E., Carlini, C. R. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science*. 167, 241-246, 2004a.

Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G. E., Oliveira-Severo, D., Carlini, C. R.. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases. Biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 271, 1357-1363, 2004b.

Fosket, D.E. In "Plant Growth and development: a molecular approach" Academic Press, London, pág 432-454, 1994.

Frutos, R.; Rang, C. and Royer, M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Critical Review Biotechnology*, 19: 227-276, 1999.

Fu, X., Duc, L.T., Fontana, S., Bong, B.B., Tinjuangjun, P., Sudhakar, D., Twyman, R.M., Christou, P. & Kohli, A. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequence generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research*, 9: 11-19, 2000.

Gatehouse, A.M.R.; Boulter, D. and Hilder, V.A. Potencial of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: *Biotechnology in Agriculture, Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, CAB Internacional, 7: 155-181, 1992.

Gatehouse, A.M., Hilder, V.A., Powell, K.S., Wang, M., Davison, G.M., Gatehouse, L.N., Down, R.E., Edmonds, H.S., Boulter, D. and Newell, C.A.. Insect-resistant

transgenic plants: choosing the gene to do the 'job'. *Biochemical Society Transactions*, 22:944-949, 1994.

Gelvin, S. The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion Biotechnology*, 9: 227-232, 1998.

Gerhardt, I.R., Paes, N.S., Bloch Jr, C. Mendes, P.A.M., Leite, A., Chrispeels, M.J. Grossi de As, M.F. Molecular characterization of a new arcelin-5 gene. *Biochemical and Biophysical Acta*, 93352. 1-11, 1999.

Ghazaleh, F.A., Francischetti, I.M., Gombarovits, M.E. and Carlini, C.R. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339:362-367, 1997.

Goldraij, A. & Polacco, J.C., Arginase is inoperative in developing soy-bean embryos. *Plant Physiology*, 119: 297–303, 1999.

Gombarovitz, M.C. Peptídeos entomotóxicos gerados a partir da canatoxina: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. Dissertação de Mestrado, UFRJ, Brasil, 1999.

Grant G, Ewen S W B, Bardocz S, Brown D S, Doward P M, Watt W B, Stewart J C, Pusztai A. Local (gut) and systemic responses of rats to dietary soybean

(*Glycine max*) proteins. In Huisman J, Van Der Poel T F B, Liener I E. (eds) Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds. Wageningen, Netherlands, Pudoc. p 34-38, 1989.

Grant G. Anti-nutritional effects of soybean: A review. *Programe of. Food Nutrition and Science*, 13, 317-348, 1989.

Grant, G. Lectins. In: Toxic Substances in Crop Plants. De Mello, J.P.F., Duffus, C.M. and Duffus, J.H. eds. The Royal Society of Chemistry, London, 49-67, 1991.

Grant G.; Dorward P.M.; Buchan W.C. Armour J.C. Pusztai A. Consumption of diets containing raw soyabeans (*Glycine max*), kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), cowpeas (*Vigna unguiculata*) or lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days: effects on body composition and organ weights. *Brazilian Journal of Nutrition*, 73,17-29, 1995.

Grant G, More L J, McKenzie N H, Doward P M, Buchan W C, Telek L, Pusztai A. Nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. *Journal of Agricultural Science*, v 124, p 437-445, 1995.

Grant, S.R. Dissecting the mechanisms of post-transcriptional gene silencing: divide and conquer. *Cell*, 96: 303-306, 1999.

Grossi-de-Sá, M.F.; and Chrispeels, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4): 271-281, 1997.

Grossi-de-Sá, M.F.; Mirkov, T.E.; Ishimoto, M.; Colucci, G.; Baterna, K.S. and Chrispeels, M.J. Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta*, 203: 295-303, 1997.

Hall, F.R. Pesticide application technology and integrated pest management (IPM). In: Pimentel D. (ed), Handbook of pest agement in agriculture. CRC Press, Boca Raton, 153-163, 1991.

Ham, W.W.; Sandstedt, R.M. & Mussehl, F.E. The proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meaks and its effect upon growth in chicks. *Journal of Biological Chemistry*, 161: 635, 1945.

Herget, T. Schell, J. And Schreeier, T.H. Elicitor specific induction of one member of the quitinase gene family in *Arachis hipogea*. *Molecular Gene Genetics*, 224: 469-476, 1990.

Hilder, V.A. & Boulter, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance- a critical review. *Crop Protection*, 18: 177-191, 1999.

Hilder, V. A., Gatehouse, A., Sheerman, S., Barker, R. & Boulter, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160-163, 1987.

Hirsch, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion on Plant Biology*, 2:320-326, 1999.

Holland, M.A., Griffin, J.D., Meyer-Bothing, L.E., Polacco, J.C. Developmental genetics of the soybean urease isozymes. *Developmental Genetics*, 8, 375-387, 1987.

Huesing, J.E., Murdock, L.L. and Shade, R.E. Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. *Phytochemistry*, 30 (11) 3565-3568, 1991.

Ishimoto, M.; Sato, T.; Chrispeels, M.J. and Kitamura, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed  $\alpha$ -amylase inhibitors of common bean. *Entomologica Experimentalis Applicata*, 70: 309-315, 1996.

Jouanin, L.; Bonade-Bottino, M.; Girard, C.; Morrot, G. and Giband, M. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*, 131: 1-11, 1998.

Kerr, P. S., D. G. Blevins, B. J. Rapp, and D. D. Randall. Soybean leaf urease: comparison with seed urease. *Physiologia Plantarum*, 57:339-345, 1983.

King, T.P., Pusztai, A., Grant, G., and Slatter, D. Immunogold localization of ingested kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in epithelial cells of the rat small intestine. *Histochemical Journal*, 18, 413-420, 1986.

Klose, A.A.; Hill, B. & Fevold H.L. Presence of a growth inhibiting substance in raw soybean. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 62: 10, 1946.

Knowles B.H. and Dow, J.A.T. The crystal endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*: models of action on the insect midgut. *BioEssays*, 15: 468-476, 1993.

Kocourek, J. & Freed, D.L.J. (Eds). In; *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol 7. Textop. Denmark, 1990.

Koiwa, H.; Kato, H.; Nakatsu, T.; Oda, J.; Yamada, Y.; and Sato, F. Purification and characterization of tobacco pathogenesis- related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. *Plant and Cell Physiology*, 38:783-791, 1997.



Khush, G.S. Green revolution preparing for the 21<sup>st</sup> century. *Genome*, 42: 646-655, 1999.

Kumar, S. & Fladung, M. Controlling transgene integration in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 155-159, 2001.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

Lam, H.M.; Coschigano, K.T.; Oliveira, I. C.; Melo-Oliveira, R. & Coruzzi, G. M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 569–593, 1996.

Lecardonnell, A., Chauvin, L., Jouanin, L., Beaujean, A., Prevost, G. & Sangwan-Norrel, B. effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Science*, 140: 71-79, 1999.

Lepel, J.C., Bonadé-Botino, M., Augustin, S., Pilate, G.C.E., Tan, V.D., Delplanque, A., Cornu, D. & Jouanin, L. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera): Crysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Molecular Breeding*, 1: 319-328, 1995.

Liener, I. E.. Nutritional Significance of Lectins in the diet. In: *The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.*, edited by I. E. Liener, N. Sharon, and I. Goldstein, New York:Academic Press, p. 527-600, 1986.

Liener, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 34, 31-67, 1994.

Logemann, J. And Schell, J. The impact of biotechnology on plant breeding, or how to combine increases in agricultural productivity with improved protection of the environment. In: Chet I. (ed), *Biotechnology in plant disease control*. Wiley-Liss, Nova Iorque, 1-14, 1993.

Lutterell, R.G., Fitt, G.P., ramalho, F.S. & Sugonyaev, E.S. Cotton pest management: A worldwide perspective. *Annual Review of Entomology*, 39: 517-526, 1994.

Macedo, M.L.R., Andrade, L.B.S.; Moraes, R.A. and Xavier-Filho, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105C(1): 89-94, 1993.

Martinelli, A.H.S. Toxicidade de urease de soja [*Glycine max* (L) Merrill] a fitopatógenos. Trabalho de Conclusão Ciências Biológicas, Unisinos, Brasil, 2004.

Martin, F.W. Grain legumes. In: Handbook of tropical food crops. Martin F.W. (ed). CRC Press, Florida, 27-57, 1984.

Matzke, A.J.M. & Matzke, M.A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 142-148, 1998.

McGaughey, W.H. & Whalon, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258: 1451-1455, 1992.

McManus, M.T. & Burgess, E.P.J. effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on the growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology*, 41: 731-738, 1995.

Mello, M.O. & Silva-Filho, M.C. Plant-insect interactions: na evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(92): 71-81, 2002.

Memelink, J., Swords, K. M. M., Staehelin, L. A., and Hoge, J. H. Southern, Northern and Western blot analysis. In: Gelvin SB and Schilperoot RA (eds), *Plant Molecular Biology Manual*. (pp. F1/1-23) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1994.

Meyer, P. The role of chromatin remodeling in transgene silencing and plant development. *In Vitro Cell Development Biology / Plant*, 35: 29-36, 1999.

Meyer-Bothling, I.E., Polacco, J.C. Mutational analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. *Molecular Gene Genetics*, 209, 439-444, 1987.

Milton, J.M. and Taylor, I.E.P. *Biochemical Journal*, 113, 678-680, 1969.

Miranda, R.; Zamudio, F.Z. and Bravo, A. Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12): 1155-1163, 2001.

Mobley, H. L. and R. P. Hausinger. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiology Reviews*, 53 (1):85-108, 1989.

Mobley, H. L., Island, M. D., and Hausinger, R. P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiology Reviews*, 59, 451-480, 1995.

Mohan-Babu, R.; Sajeena, A.; Seetharaman, K. And Reddy, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an over view. *Crop Protection*, 22: 1071-1086, 2003.

Morton, R.L.; Schroeder, H.E.; Bateman, K.S.; Chrispeels, M.J.; Armstrong, E. and Higgins, T. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peans (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:3820-3825, 2000.

Mulinari, F. Jaburetox-2Ec: um peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com potencial bioinseticida. Dissertação de Mestrado, UFRGS, 2004.

Musser, F.R. and Shelton, A.M. *Bt* sweet and selective insecticides: impacts on pest and predators. *J. Econ. Entomol.*, 96: 71-80, 2003.

Norton G. 1991. Proteinase inhibitors. In: D'Mello J P F, Duffus C M, Duffus J M (eds). *Toxic Substances in Crop Plants*. Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry. 69-106.

Oerke, E.C.; Dehne, H.W.; Schonbeck, F. And Weber. *Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops*. Elsevier, Amsterdam, 1994.

Oliveira A. E., Gomes V. M., Sales M. P., Fernandes K. V., Carlini C. R., and Xavier-Filho J. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Revista Brasileira de Biologia*, 59, 59-62, 1999.

Oliveira, J.T.A.; Puzstai A.; Grant G. Changes in organs and tissues induced by feeding of purified kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins. *Nutrition Research*, 8, 943-947, 1988.

Oliveira J.T.A.; Vasconcelos, I.M.; Gondim M.J.L.; Cavada B.S.; Moreira, R.A.; Santos C.F.; Moreira L.I.M. *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 64, 417-424, 1994.

Osborn, T.C., Alexander, D.C., Sun, S.S.M., Cardona, C. and Bliss, F.A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, 240, 207-210, 1988.

Paulillo, L.C.M.S., Lopes, A.R., Cristofolletti, P.T., Parra, J.R.P., Terra, W.R & Silva-Filho, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *J. Econ. Entomol.* 93: 892-896, 2000.

Peferoen, M. Progress and prospects for field of *Bt* genes in crops. *Trends Biotechnology*, 93: 892-896, 1997.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109: 347-352, 1995.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 7: 132-138, 1996.

Pires-Alves, M., Grossi-de-Sá, M. F., Barcellos, G. B. S., Carlini, C.R., Moraes, M.G. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant and Cell Physiology*, 44, 139-145, 2003.

Polacco J.C.; and Havir E. Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 1707-1715, 1979.

Polacco, J. C. and R. G. Winkler. Soybean leaf urease: a seed enzyme ? *Plant Physiology*, 74:800-803, 1984.

Polacco, J. C., R. W. Krueger, and R. G. Winkler. Structure and possible ureide degrading function of the ubiquitous urease of soybean. *Plant Physiology*, 79:794-800, 1985.

Polacco, J.C., Judd, A.K., Dybing, J.K., Cianzio, S.R. A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots. *Molecular Gene Genetics*, 217:257-262, 1989.

Polacco J.C.; and Holland M.A. Roles of urease in plant cells. *In International Review of Cytology*, 145:56-103, 1993.

Pusztai A.; Ewen, S.W.B.; Grant G.; Peumans W.L. Van Damme E.J.M.; Rubio L.; Bardocz S. Relationship between survival and binding of plants lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*, 46, 308-316, 1990.

Pusztai A.; Bardocz S. Physiological role(s) of lectins in plants and the effects of their inclusion in the diet on the gut and metabolism of mammals. In: *Phytochemicals and Health, 10<sup>th</sup> Annual Penn State Symposium in Plant Physiology*. Eds Gustine D L & Flores H E. Pennsylvania, USA, 179-191, 1995.

Qaim, M. and Zilberman, D. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science*, 299: 900-902, 2003.

Riddles, P.W, Andrews, R.K., Blakeley, R.L. and Zerner, B. Jack bean urease. VI. Determination of thiol and disulphide content – reversible inactivation of the enzyme by the blocking of the unique cysteine residue. *Biochim Biophys. Acta.*, 743:115-120, 1983.



Roberts, D. D. and I. J. Goldstein. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Biological Chemistry*, 258:13820-13824, 1983.

Rukmini, V.; Reddy, C.Y. and Venkateswerlu, G. *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin: role of proteases in the conversion of protxin to toxin. *Biochimie*, 82: 109-116, 2000.

Ryan, C.A. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defense against herbivores. *Bioessays*, 10, 20-24, 1989.

Ryan, C. A.. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28:425-449, 1990.

Saido-Sakanaka, H., Ishibashi, J., Momotani, E., Amano, F. & Yamakawa, M. In vitro and in vivo activity of antimicrobial peptides synthesized based on the insect defensin. *Peptides*, 25 (1): 19-27, 2004.

Sambrook, J.R. & Russel, D.W. *Molecular Cloning. Laboratory Manual*. CSHL, New York, 3 Vol, 2001.

Schuler, T. H., G. M. Poppy, B. R. Kerry, and I. Denholm. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, 16(4):168-175, 1998.

Schroeder, H.E.; Gollasch, S.; Moore, A.; Tabe, L.M.; Craig, S.; Hardie, D.C.; Chrispeels, M.J.; Spencer, D. and Higgins, T.J. bean alpha-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology*, 107:1233-1239, 1995.

Sehgal, P.P. and Naylor, A.W. Ontogenetic study of urease in jackbeans, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Bot. Gaz.* 127:27-34, 1966.

Shade, R.E.; Schroeder, H.E.; Pueyo, J.J.; Tabe, L.M.; Murdock, L.L.; Higgins, T.J.V. and Chrispeels, M.J. Transgenic pea seeds, expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *BioTechnology*, 12:793-797, 1994.

Sirko, A. and Brodzik, R. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4):1189-1195, 2000.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T. Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. *Analytical Biochemistry*, 150, 76, 1985.

Stanisçuaski, F., Ferreira-daSilva, C.T., Mulinari, F., Pires-Alves, M. and Carlini, C.R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 2005. No prelo.

Staples, S. J. and F. J. Reithel. Evidence for an active-inactive subunit complex in jack bean urease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 174:651-657, 1976.

Stebbins, N., Holland, M. A., Cianzio, S. R., and Polacco, J. C. Genetic Tests of the Roles of the Embryonic Ureases of Soybean. *Plant Physiology* 97:1004-1010, 1991.

Stebbins, N.E. and polacco, J.C. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiology*, 109:169-175, 1995.

Strobl, S.; Maskos, K.; Wiegand, G.; Huber, R.; Gomis-Ruth, F.X. and Glockshuber, R.A. A novel strategy for inhibition of alpha-amylases: yellow meal worm alpha-amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure*, 6(7): 911-921, 1998.

Sumner, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry*, 69: 435-441, 1926.

Sumner J B, Howell S F. Identification of the hemagglutinin of jack bean with Con A. *Journal of Bacteriology*, 32, 227, 1936.

Tabashnik, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39: 47-79, 1994.

Terra, W.R, Ferreira, C. and Garcia, E.S. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochemistry*, 18:423-434, 1988.

Terra, W.R. and Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1):1-62, 1994.

Torisky, R. S. and J. C. Polacco. Soybean roots retain the seed urease isoenzyme synthesized during embryo development. *Plant Physiology*, 94:681-689, 1990.

Toriski R.S.; Griffin, J.D.; Yenofsky R.L.; and Polacco, J. C. A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Molecular Gene Genetics*, 242:404-414, 1994.

Towbin, H., Staehelin, T. Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 4350-4354, 1979.

Ubatuba F B. Ocurrance of a trypsin inhibiting factor in the seeds of *Canavalia ensiformis*. *Revista Brasileira de Biologia*, 15:1-8, 1955.

Urwin, P.E., Atkinson, H.J. & McPherson, M.J. Involvement of the N<sub>h</sub>2-terminal region of oryzacystatin-I in cysteine proteinase inhibitor. *Protein Engineer*, 8:1303-1307, 1995.

Ussfful, P.E., Laxmi, N.H. Mitra, R. Proteinase inhibitors: plant derived genes of insecticidal protein for developing resistant transgenic plants. *Current Science*, 80: 847-853, 2001.

Van Driessche, E., Fischer, J., Beeckmans, S., Bog-Hanse, T.C. (Eds). In: Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Vol 11. Denmark, 1996.

Vázquez-Padrón, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., La Riva, G.A. & López-Revilla, R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Science*, 64:1897-1912, 1999.

Vázquez-Padrón, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., Martinez-Gil, A.F., La Riva, G.A. & López-Revilla, R. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1A protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 33: 147-155, 2000.

Wang, J.H. & Tarr, D.A. On the mechanism of the urease action. *Journal of American Chemistry Socite*, 77:6205-6206, 1955.

Werner, M.H., Wemmer, D.E. Three-dimensional structure of soybean trypsin/chymotrypsin Bowman-Birk in solution. *Biochemistry*, 31:999-1010, 1992.

Westfall, R.J. & Hauge, S.M. The nutritive quality and trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. *Journal of Nutrition*, 35: 374, 1948.

Wilcox, J.R., Laviolette, F.A. & Athow, K.L. Deterioration of soybean seed quality associated with delayed harvest. *Plant Disease Reporter*, 58: 130-133, 1974.

Witte, C. P., Tiller, S. A., Taylor, M. A., and Davies, H. V. Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of N-15 after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiology* 128, 1129-1136, 2002.

Zerner, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry*, 19:116-131, 1991.

Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R.A.; Shade, R.E. & Ahn, J.E. Cowpea bruchid *Callosobruchos maculatus* uses a three-component strategy to overcome a

plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 12 (2): 135-145, 2003.

## **Anexo 1**

### **Currículo Lattes**



## Curriculum Vitae - CNPq

Fevereiro/2005

---

### Dados Pessoais

Nome Arlete Beatriz Becker Ritt

Nome em citações BECKER-RITT, A. B.

bibliográficas

Sexo feminino

Filiação Romeu Ritt e Cacilda Juliana Becker Ritt

Nascimento 12/09/1967 - Crissiumal/RS - Brasil

Carteira de Identidade 2034896924 SSP - RS - 08/02/1984

CPF 52128849004

Endereço residencial Av Bento Gonçalves, 2306 apto 604

Partenon - Porto Alegre

90650001, RS - Brasil

Telefone: 51 33842043

E-mail: arletebr@cbiot.ufrgs.br

URL da home page: <http://www.ufrgs.br/laprotox>

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica

Av Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43422 - Lab 204 - Proteínas Tóxicas

Agronomia - Porto Alegre

91501-970, RS - Brasil

Telefone: 51 33167606

E-mail: arletebr@cbiot.ufrgs.br

URL da home page: <http://www.ufrgs.br/laprotox>

---

### Formação Acadêmica/Titulação

2001 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

1999 - Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

2001 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Proteínas Canatoxina-like e outros potenciais fatores anti-nutricionais em

sementes de soja *Glycine max.*, Ano de obtenção: 2001

Orientador: Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Palavras-chave: soja, fatores antinutricionais, canatoxina, proteína, toxicidade

Áreas do conhecimento : Proteínas

Setores de atividade : Produtos e processos biotecnológicos, Nutrição e alimentação, Saúde humana

1993 - Graduação em Ciências Licenciatura Plena.

1998 Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, UNIJUI, Ijuí, Brasil

---

## Formação complementar

- 2000 - Curso de curta duração em Protein e Peptide Purification Strategy.  
2000 Amershan Pharmacia Biotech, APB, Brasil, Ano de obtenção: 2000
- 2003 - Curso de curta duração em Seqüenciamento e Análise de Genomas.  
2003 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, Ano de obtenção: 2003
- 2003 - Curso de curta duração em Desenvolvimento de maracdores Moleculares.  
2003 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, Brasil, Ano de obtenção: 2003
- 

## Atuação Profissional

### 1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

#### Atividades

03/2001 - 04/2001 **Graduação**

1. Biofísica Celular BIO10382

08/2001 - 09/2001 **Graduação**

1. Biofísica Celular BIO10382

09/2003 - 12/2003 **Graduação**

1. Biofísica de Proteínas BIO10329

---

## Áreas de atuação

- 1 Proteínas
  - 2 Bioquímica
- 

## Idiomas

Entende Inglês (Pouco)  
Fala Inglês (Pouco)  
Lê Inglês (Razoavelmente)  
Escreve Inglês (Pouco)

---

---

## Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

1.

BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., CARLINI, C. R. R. S.  
Expressão de ureases de soja em tabaco (*Nicotiana tabacum*) Análise de resistência a insetos e fitopatógenos. In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado - RS.  
**Programa e Resumos.** , 2004. v.1. p.1 - 695

Palavras-chave: expression, soja, tobacco, urease, toxicidade

Áreas do conhecimento : Biologia Geral,Biologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso, Home page: [www.xxobe.com.br](http://www.xxobe.com.br)

2.

BECKER-RITT, A. B., CARLINI, C. R. R. S., MARTINELLI, A. H. S., PASQUALI, G.  
Soybean [*Glycine max* (L) Merrill] Ureases: Expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) In: XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004, Caxambú - RS.

**XXXIII Reunião Anual Programa e Índices.** São Paulo: SBBq, 2004. p.48 -

Palavras-chave: expression, tobacco, urease

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Enzimologia

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários, Home page: [www.sbbq.org.br](http://www.sbbq.org.br)

3.

BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., CARLINI, C. R. R. S., PASQUALI, G.  
Soybean [*Glycine max* (L) Merrill] ureases: expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*). In:  
Agricultural Biotechnology International Conference, 2004, Cologne.

**Posters Abstracts.** Cologne: , 2004. v.1. p.1 - 42

Palavras-chave: expression, soja, tobacco, toxicidade, urease

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular

Referências adicionais : Alemanha/Inglês. Meio de divulgação: Outro, Home page: [www.abic2004.org](http://www.abic2004.org)

4.

BECKER-RITT, A. B., CARLINI, C. R. R. S., Mulinari F  
Antinutritional and/or toxic proteins in soybean seeds (*Glycine max* (L) Merrill). Comparison among different cultivars In: XXX Reunião Anual da SBBq, 2001, Caxambú - MG.

**Program e Resumos da XXX Reunião Anula da SBBq.** , 2001. v.Único. p.168 -

Palavras-chave: proteína, soja, toxicidade

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5.

BECKER-RITT, A. B., CARLINI, C. R. R. S., Mulinari F  
High molecular mass canatoxin-like proteins in soybean (*Glycine max*)seeds is an isoform of urease In: XXX Reunião Anual da SBBq, 2001, Caxambú - MG.

**Programa e Resumos da XXX Reunião Anual da SBBq.** , 2001. v.Único. p.178 -

Palavras-chave: canatoxina, proteína, soja, urease

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6.

BECKER-RITT, A. B., CARLINI, C. R. R. S., Mulinari F  
Isolation and characterization of high molecular weight protein related to canatoxin from soybean (Glycine max) seeds In: XXIX Reunião Anual SBBq, 2000, Caxambú - MG.  
**Programa e Resumos da XXIX Reunião Anual da SBBq.** São Paulo: Tec Art Editora, 2000.  
v.Único. p.137 -

Palavras-chave: canatoxina, fatores antinutricionais, proteína, soja

Setores de atividade : Produtos e processos biotecnológicos

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

7.

BECKER-RITT, A. B., CARLINI, C. R. R. S.  
Isolamento e caracterização parcial de uma proteína tóxica de alto peso molecular em sementes de soja In: IX Simpósio Latino-Americano Farmacologia e III Reunião da Sociedade Latino-Americana de Fitoquímica, 1999, Gramado - RS.  
**Livro de Resumos.** Porto Alegre: Editora UFRGS, 1999. v.1. p.224 -

Palavras-chave: soja, canatoxina, fatores antinutricionais

Áreas do conhecimento : Proteínas

Setores de atividade : Produtos e processos biotecnológicos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

---

---

## Artigos completos publicados em periódicos

1.

BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., FIUZA, L. M., CARLINI, C. R. R. S., PASQUALI, G.  
SUBMETIDO: Expression of soybean (Glycine max (L) Merrill ubiquitous urease in tobacco (Nicotiana tabacum) and antifungal activity of soybean ureases. Plant Cell and Physiology. Japão: , v.0000, n.0000, p.0000 - 0000, 2005.

Palavras-chave: urease, transgenic plant, expression, plant pathogen

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Enzimologia,Proteínas

Referências adicionais : Japão/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

2.

BECKER-RITT, A. B., CARLINI, C. R. R. S., Mulinari F, Vasconcelos IM  
Antinutritional and/or toxic factors in soybean seeds (Glycine max (L) Merrill). Comparison among different cultivars adapted to the South Region of Brazil (Submit). Journal of the Science of Food and Agriculture. Londres: , v.84, n.0000, p.263 - 270, 2004.

Palavras-chave: fatores antinutricionais, proteína, soja, toxicidade, urease

Áreas do conhecimento : Bioquímica

Setores de atividade : Produtos e processos biotecnológicos

Referências adicionais : Inglaterra/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

---

## Outras produções bibliográficas

1.

BECKER-RITT, A. B.

**Bioquímica**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda, 2000. (Livro, Tradução)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso  
Revisão técnica da tradução

---

## Orientações concluídas

### Trabalhos de conclusão de curso de graduação Orientações concluídas

1.

Anne Helene Souza Martinelli. **Avaliação da toxicidade de urease de soja a microrganismos fitopatógenos**. 2004. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Palavras-chave: urease, toxicidade, soja, proteína

Referências adicionais : Brasil/Português.

2.

Fernanda Mulinari. **Avaliação de proteínas tóxicas e/ou antinutricionais em sementes de soja [Glycine max (L.) Merrill] de diferentes cultivares**. 2002. Curso (Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Palavras-chave: fatores antinutricionais, proteína, soja, toxicidade, soyatoxina, lectinas

Áreas do conhecimento : Bioquímica

Referências adicionais : Brasil/Português.

---

## Participação em eventos

1.

BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., CARLINI, C. R. R. S.

**Expressão de ureases de soja em tabaco (Nicotiana tabacum) análise da resistência a insetos e fitopatógenos**, 2004. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso, Home page: [www.xxcbce.org.br](http://www.xxcbce.org.br)

2.

BECKER-RITT, A. B., CARLINI, C. R. R. S., PASQUALI, G., MARTINELLI, A. H. S.  
**Soybean [Glycine max (L) Merrill] Ureases: Expression in tobacco (Nicotiana tabacum).**, 2004.  
(Congresso, Participações em eventos)

Palavras-chave: urease, expression, tobacco

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Enzimologia

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários, Home page: [www.sbbq.org.br](http://www.sbbq.org.br)

3.

BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., CARLINI, C. R. R. S., PASQUALI, G.  
**Soybean [Glycine max (L) Merrill] ureases: expression in tobacco (Nicotiana tabacum).**, 2004.  
(Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Alemanha/Inglês. Meio de divulgação: Outro, Home page: [www.abic2004.org](http://www.abic2004.org)

4.

BECKER-RITT, A. B.  
**Biotechnologia, alguns usos e aplicações - Proteínas tóxicas e/ou fatores antinutricionais presentes em sementes de soja (Glycine max (L) Merrill), comparação entre cultivares da região Sul do Brasil**, 2003. (Seminário, Participações em eventos)

Palavras-chave: expression, fatores antinutricionais, soja, tobacco, urease

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Enzimologia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro, Home page: [www.unijui.tche.br](http://www.unijui.tche.br)

5.

BECKER-RITT, A. B.  
**OGM: A visão da ciência**, 2003. (Outra, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

6.

BECKER-RITT, A. B.  
**Aperfeiçoamento de Professores de Química**, 1997. (Outra, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

7.

BECKER-RITT, A. B.  
**Aprendizagem em Química, na Área de Ciências: Ênfase nas 4as e 5as Séries do Ensino Fundamental**, 1997. (Seminário, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8.

BECKER-RITT, A. B.  
**Aprendizagens possíveis, em Química, nas 4as e 5as Séries no Ensino Fundamental**, 1997.  
(Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

9.  
BECKER-RITT, A. B., BINI, A. B., ZANON, L. B.  
**Aprendizagens possíveis, em química, nas 4as e 5as séries do ensino.**, 1997.  
(Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

10.  
BECKER-RITT, A. B., ZANON, L. B., BINI, A. B.  
**Inter-relações envolvendo os temas alimentação/energia e os conceitos substância/transformação no ensino de ciências**, 1997. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

11.  
BECKER-RITT, A. B.  
**Leite como tema organizador de aprendizagens em química no ensino fundamental**, 1997.  
(Encontro, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

12.  
BECKER-RITT, A. B.  
**Produtos Naturais no Controle de Insetos**, 1997. (Oficina, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

13.  
BECKER-RITT, A. B.  
**XII Simpósio Sul-Brasileiro de Ensino de Ciências**, 1997. (Simpósio, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

14.  
BECKER-RITT, A. B.  
**III SECIM**, 1996. (Seminário, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português.

15.  
BECKER-RITT, A. B.  
**XVI EDEQ**, 1996. (Simpósio, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

---

## Indicadores de produção

### Produção bibliográfica

Artigos publicados em periódicos

2

Completos	2
Trabalhos publicados em anais de eventos	7
Resumos	7
Demais tipos de produção bibliográfica	1
Livros	1
<b>Orientação concluída</b>	
Trabalhos de conclusão de cursos de graduação	2
<b>Informações complementares</b>	
Participações em eventos	15

---