

HEBRÉIA OLIVEIRA ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE
FOLHAS DE BERINJELA PARA O CONTROLE DE PATÓGENOS
DE PLANTAS**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A447i
2007

Almeida, Hebréia Oliveira, 1983-
Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de
berinjela para o controle de patógenos de plantas /
Hebréia Oliveira Almeida. – Viçosa, MG, 2007.
xvi, 110f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Cristina Baracat Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 76-90.

1. Peptídios antimicrobianos. 2. Proteínas -
Separação. 3. Berinjela - Resistência a doenças e
pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.65

HEBRÉIA OLIVEIRA ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE
FOLHAS DE BERINJELA PARA O CONTROLE DE PATÓGENOS
DE PLANTAS**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 12 de março de 2007.

Prof.^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Co-Orientadora)

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Co-Orientador)

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof. Adriano M. de Castro Pimenta

Prof.^a Maria Cristina Baracat Pereira
(Orientadora)

Dedico minha dissertação a meus pais, Jaime e Fátima, e a meus irmãos, Ana Maria e André Lucas, pelo amor incondicional, e por terem abraçado meus sonhos como se fossem deles próprios.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em todos os momentos;

À Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar minha formação e realização desse trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos ensinamentos e por todo o auxílio prestado;

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro;

À minha orientadora, Maria Cristina Baracat Pereira, pela orientação, apoio, paciência e, principalmente, pela amizade e confiança depositada em mim no decorrer de nosso trabalho;

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pelo apoio e disponibilidade do laboratório para a realização deste projeto;

Ao Professor Leandro Grassi de Freitas, pela disponibilidade de utilização do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides, por toda a atenção, e à sua equipe, pelo grande auxílio prestado;

Ao Professor Adriano M. de Castro Pimenta e a todos do Núcleo de Biomoléculas/UFMG pelo grande auxílio prestado nas análises de espectrometria de massa.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica e do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pelo agradável ambiente de trabalho e pela amizade;

Aos amigos Meire, Carlos, Rubens, Gilvan, Eliciane e Paulo Wagner, pelos ensinamentos e pela ajuda constante, por me acompanharem de perto, torcendo e sofrendo junto;

A todos os amigos do curso de Bioquímica na UFV;

Às minhas grandes amigas e irmãs do coração, Fernanda, Thaís, Luciana e Priscila, pelo apoio nas horas difíceis e por terem feito os dias muito mais felizes;

Às minhas amigas da república, pela paciência e pelas palavras de estímulo nos dias mais difíceis;

Ao Eduardo Monteiro, por todo o cuidado, por ter me ajudado tanto e por todo o carinho;

Aos meus pais e aos meus irmãos, que entenderam meus momentos de ausência e me amaram acima de tudo;

A todos os meus familiares e amigos, que de alguma forma contribuíram para a realização desta conquista;

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

HEBRÉIA OLIVEIRA ALMEIDA, filha de Jaime Nunes Almeida e Maria de Fátima Oliveira Almeida, nasceu no dia trinta e um de janeiro de 1983, em Porteirinha, MG.

Em março de 2001, ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em julho de 2005.

Em agosto de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese em março de 2007.

SUMÁRIO	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1. Peptídeos antimicrobianos.....	3
2.2. Classificação dos peptídeos antimicrobianos.....	4
2.3. Peptídeos antimicrobianos na defesa de plantas.....	5
2.4. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	8
2.5. Localização celular de peptídeos antimicrobianos.....	11
2.6. Patógenos de plantas.....	11
2.7. Aplicações futuras do conhecimento sobre peptídeos vegetais.....	13
3. Material e Métodos.....	16
3.1. Material vegetal: Plantio das Sementes de Berinjela e Coleta das Folhas e Plântulas.....	16
3.2. Microrganismos	16
3.3. Obtenção de Extrato Solúvel Bruto.....	17
3.4. Obtenção do Extrato de Parede Celular Bruto.....	17
3.5. Purificação Parcial dos Peptídeos.....	18
3.5.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	18
3.5.2. Aquecimento Seletivo	18
3.5.3. Cromatografias de Troca Iônica em equipamento tipo FPLC.....	18
3.5.4. Cromatografia de Exclusão Molecular	19
3.5.5. Cromatografia de Fase Reversa em equipamento tipo HPLC.....	19
3.6. SDS –Tricina – PAGE de Três Fases.....	19
3.7. Testes de inibição dos patógenos <i>in vitro</i>	20
3.7.1. Testes de atividade antibacteriana em microplacas.....	20
3.7.2. Avaliação da inativação ou morte de juvenis de nematóides.....	21
3.8. Avaliação dos extratos peptídicos <i>in vivo</i> sobre as bactérias fitopatogênicas.....	22
3.9. Seqüenciamento e determinação da massa molecular por técnica	

espectrométrica do peptídeo purificado.....	23
3.10. Identificação de seqüências homólogas de defensinas em banco de dados	24
Capítulo I - Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de plantas de berinjela em três estádios de desenvolvimento.....	25
I.1. Introdução.....	25
I.2. Resultados e Discussão.....	26
I.3. Conclusões.....	33
Capítulo II - Bioprospecção de peptídeos antimicrobianos em folhas totalmente expandidas de berinjela.....	34
II.1. Introdução.....	34
II.2. Resultados e Discussão.....	35
II.2.1. Purificação de ES em resina Q-Sepharose seguida por fase reversa C18-HPLC.....	35
II.2.2. Purificação por Sephadex G-10 seguida por C18-HPLC.....	45
II.3. Conclusões.....	58
Capítulo III - Aplicação biotecnológica agropecuária dos extratos peptídicos	60
III.1. Introdução.....	60
III.2. Resultados e Discussão.....	62
III.2.1. Avaliação da inativação ou morte de juvenis de nematóides por extratos peptídicos de folhas de berinjela.....	62
III.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> dos extratos de folhas de berinjela.....	66
III.3. Conclusões.....	72
Conclusões Gerais.....	74
Referências.....	76
Anexos.....	91
Anexo 1.....	92
Anexo 2.....	100

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 01 - Representação esquemática de uma estrutura tridimensional de uma defensina de insetos (Insect defensin A), de uma defensina de plantas (Rs-AFP1), e de uma defensina de mamíferos (HNP-3).....	8
FIGURA 02 - Fluxograma com a metodologia de purificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela.....	27
FIGURA 03 - Perfis cromatográficos de troca aniônica em DEAE-Sepharose de ES e de EP de plantas de berinjela da variedade Florida Market com 5 cm e 15 cm de altura e de folhas totalmente expandidas.....	29
FIGURA 04 - Protocolo geral de purificação do peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela e os ensaios biológicos com os diversos <i>pools</i> obtidos em A.....	36
FIGURA 05 - Perfil cromatográfico de troca aniônica em Q-Sepharose e CM-Sepharose de ES de folhas totalmente expandidas de berinjela.	37
FIGURA 06 - Atividade antimicrobiana dos <i>pools</i> catiônicos, aniônico e aniônico 1 obtidos do extrato solúvel de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market contra as bactérias <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	39
FIGURA 07 – Percentagem de inibição do extrato dos <i>pools</i> catiônicos, aniônico e neutro obtidos do extrato solúvel de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market sobre o crescimento de <i>Ralstonia solanacearum</i> e de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	40
FIGURA 08 - SDS-Tricina-PAGE de três fases do pico catiônico 1 de extrato solúvel de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market, após troca aniônica em Q-Sepharose.....	42
FIGURA 09 – Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do <i>pool</i> catiônico 1, obtido da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose do extrato solúvel de folhas totalmente expandidas da variedade de berinjela Florida Market.....	43
FIGURA 10 – Espectrometria de massa do pico 18 e 24 eluídos na cromatografia de fase reversa do <i>pool</i> catiônico 1 da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose do extrato solúvel de folhas totalmente expandidas da variedade de berinjela Florida Market.....	44
FIGURA 11 – Perfil cromatográfico da separação do Extrato de Solúvel de folhas totalmente expandidas, de berinjela da variedade Florida Market em uma coluna Sephadex-G10.....	46
FIGURA 12 - Perfil cromatográfico da separação de Extrato de Parede Celular de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market em uma coluna Sephadex-G10.....	47
FIGURA 13 – Atividade antimicrobiana dos <i>pools</i> (P1, P2, P3 e P4) do	

extrato solúvel celular e do extrato de parede celular de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market, após cromatografia em Sephadex G-10, contra a bactéria <i>R. solanacearum</i>	48
FIGURA 14 – Atividade antimicrobiana dos <i>pools</i> (P1, P2, P3 e P4) do extrato solúvel e do extrato de parede celular de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market, após cromatografia em Sephadex G-10 contra a bactéria <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	49
FIGURA 15 - Percentagem de inibição dos <i>pools</i> (P1, P2, P3 e P4) do extrato solúvel e do extrato de parede celular de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market após cromatografia em Sephadex G-10 contra a bactéria <i>R.solanacearum</i>	50
FIGURA 16 - Percentagem de inibição dos <i>pools</i> (P1, P2, P3 e P4) do extrato solúvel e do extrato de parede celular de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market após cromatografia em Sephadex G-10 contra a bactéria <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	51
FIGURA 17 - SDS-Tricina-PAGE de três fases de extrato solúvel após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market.....	53
FIGURA 18 - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market.....	54
FIGURA 19 - Espectrometria de massa do pico 9 eluído na cromatografia de fase reversa das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas da variedade de berinjela Florida Market.....	55
FIGURA 20- Espectrometria de massa dos picos 11, 13 e 15 eluídos na cromatografia de fase reversa das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market.....	56
FIGURA 21- Espectrometria de massa do pico 14 eluído na cromatografia de fase reversa das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market.....	57
FIGURA 22 - Fluxograma indicando os diferentes <i>pools</i> utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.....	63
FIGURA 23 - Percentagem de mortalidade de nematóides tratados com o <i>pool</i> catiônico obtido do extrato solúvel de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market em três concentrações	

diferentes.....	64
FIGURA 24 - Curvas de progresso da doença para os controles de ES e EP após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10, nos quais água substituiu o material vegetal.....	67
FIGURA 25 – Curvas de progresso da doença para os <i>pools</i> 1 e 2 de ES após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por <i>Ralstonia solanacearum</i>	68
FIGURA 26- Curvas de progresso da doença para os <i>pools</i> 3 e 4 de ES após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10. acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por <i>Ralstonia solanacearum</i>	69
FIGURA 27 – Curvas de progresso da doença para os <i>pools</i> 2 e 3 de EP após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10. acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por <i>Ralstonia solanacearum</i>	70
FIGURA 28 - Curvas de progresso da doença para o <i>pool</i> 4 de EP após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por <i>Ralstonia solanacearum</i>	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Atividades antimicrobianas relativas ao controle da cultura dos <i>pools</i> catiônicos e aniônico de extratos solúveis e de parede celular de plantas jovens com 5 e 15 cm de altura, e de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade Florida Market.....	31
TABELA 02 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC) nos períodos de 5, 7, 10 dias após a inoculação, para os <i>pools</i> testados.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP - Peptídeo antimicrobiano
- BIS - N,N', metileno-bis-acrilamida
- CM - Carboximetil
- C₁₈ - Coluna de fase reversa contendo ligante com 18 carbonos
- DEAE - Dietilaminoetil
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- ES - Extrato solúvel
- EP - Extrato de Parede Celular
- FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography
- HPLC - High Liquid Chromatography Performance
- LiCl - Cloreto de lítio
- MES - Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico
- MM - Massa molecular
- PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila
- P - *Pool* - refere-se a um agrupamento de frações coletadas nas diferentes cromatografias
- PA - *Pool* aniônico
- PC1 - *Pool* catiônico 1
- PC2 - *Pool* catiônico 2
- PC3 - *Pool* catiônico 3
- PN - *Pool* neutro
- P1 - *Pool* 1
- P2 - *Pool* 2
- P3 - *Pool* 3
- P4 - *Pool* 4
- RP – Cromatografia de fase reversa
- SDS - Dodecilsulfato de sódio
- TFA - Ácido trifluoracético
- TRICINA - N-Tris(Hidroximetil)metilglicina
- TRIS - Tris(Hidroximetil)aminometano

RESUMO

ALMEIDA, Hebréia Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2007. **Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas.** Orientadora: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Leandro Grassi de Freitas.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são produzidos por animais, plantas, insetos e outros organismos como estratégia de defesa eficiente, flexível e com um baixo consumo de energia e biomassa, em função de seu pequeno tamanho. Em vegetais, foram identificadas dez famílias de AMPs que participam da barreira constitutiva de defesa da planta, com massas moleculares que variam de 2 a 9 kDa. Considerando a importância dos AMPs como possíveis princípios ativos para o desenvolvimento de agentes de defesa, tanto com aplicações farmacêuticas quanto para o desenvolvimento de novas classes de defensivos para a agroindústria, o objetivo desse trabalho foi detectar, extrair e purificar formas de AMPs presentes em plantas jovens e folhas totalmente expandidas de berinjela, e avaliar a ação desses peptídeos *in vitro* e *in vivo* contra fitopatógenos de interesse comercial, visando posterior clonagem e expressão heteróloga para caracterização estrutural das moléculas. O trabalho teve ainda o objetivo de explorar o potencial antimicrobiano dos extratos parcialmente purificados, obtidos de plantas jovens e folhas totalmente expandidas de berinjela, visando possível aplicação biotecnológica no controle de fitopatógenos. Folhas de plantas com 60 dias e plântulas inteiras de berinjela (5 ou 15 cm) foram trituradas, maceradas (tampão Tris-HCl, EDTA, PMSF, benzamidina e tiouréia), o extrato foi centrifugado e o sobrenadante correspondeu ao Extrato Solúvel (ES). O precipitado foi lavado (água), extraído em LiCl (EDTA, PMSF, benzamidina e tiouréia), o homogenato foi centrifugado e o sobrenadante correspondeu ao Extrato de Parede Celular (EP). EP e ES dos três estádios de desenvolvimento foram fracionados (por sulfato de amônio e aquecimento), dessalinizados, liofilizados e separados por troca aniônica em DEAE-Sephrose-FPLC. Foram obtidos dois picos catiônicos (PC1 e PC2) e um aniônico (PA) para cada estádio, que foram submetidos a testes de inibição do crescimento das bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis. Resultados indicaram maior inibição pelos EP obtidos das plantas mais jovens (5 cm), enquanto que para as plantas maduras (15 cm e folhas), ES foi mais ativo. ES de folhas maduras foi também submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna Q-Sepharose-FPLC e os cinco *pools* obtidos foram submetidos a testes antibacterianos, e PC1 foi submetido a teste de inativação ou morte de fitonematóides. PC1 mostrou-se promissor para a bioprospecção de AMPs, por apresentar tanto atividade antibacteriana quanto nematicida contra *Meloidogyne incognita*, e foi então separado em C18-RP-HPLC. Dos picos coletados, doze foram analisados por espectrometria de massa e dois deles (picos 18 e 24) apresentaram peptídeos com massas entre 2 e 9 kDa. O restante de ES e EP de folhas maduras foi separado em Sephadex G-10, quando foram obtidos quatro *pools*, tanto para ES quanto para EP, que foram submetidos a testes antibacterianos, tanto *in vitro* para as duas bactérias fitopatogênicas acima citadas, quanto *in vivo* para *Ralstonia solanacearum* em tomateiros. Alguns *pools* mostraram-se promissores, principalmente o ES-*pool* 1 obtido após a separação em Sephadex G-10, do qual duas frações foram separadas em C18-RP-HPLC e os picos submetidos à espectrometria de massa. Foram identificadas moléculas com massa molecular na região peptídica de interesse. Os peptídios presentes nas frações dos picos 9 e 14 tiveram suas seqüências aminoacídicas determinadas, que precisam ser confirmadas. Outros picos peptídicos serão submetidos a análises de espectrometria de massa, seqüenciamento e testes antimicrobianos, visando selecionar peptídeos efetivos contra fitopatógenos de interesse.

ABSTRACT

ALMEIDA, Hebréia Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007. **Identification of antimicrobial peptides of leaves of eggplant to control plant pathogen growth.** Adviser: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-Advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Leandro Grassi de Freitas.

The antimicrobial peptides (AMPs) are produced by animals, plants, insects and others organisms as an efficient, flexible and economical strategy of defense, consuming low energy and biomass, since they are small molecules. .. In plants, ten families of AMPs were identified, that are involved in the constitutive barrier of the plant defense, with molecular mass from 2 to 9 kDa. Based on the known importance of the AMPs as possible active molecules to be used for the development of defense agents for pharmaceutical applications or to the development of new classes of agriculture defensives, the goal of this project was to detect, extract and purify AMPs forms, that are present in young plants and in fully-expanded leaves of eggplants, and to evaluate the action of these peptides *in vitro* e *in vivo* against plant pathogens with commercial interest. Afterthat, this work aims the cloning and the heterolog expression in order to characterize the molecular structure of the AMPs. This project also have the goal to prospect the antimicrobial potencial of parcial-purified extracts from young plants and from fully-expanded leaves of eggplant, aiming possible biotechnological applications to control plant-pathogens growth. Leaves from 60-days plants and young plants (5 or 15 cm) of eggplants were triturated and macerated (Tris-HCl buffer, EDTA, PMSF, benzamidine and thiourea), the extract was centrifuged and the supernatant corresponded to the Soluble Extract (SE). The precipitate was washed (water), extracted with LiCl (EDTA, PMSF, benzamidina and thiourea), the homogenate was centrifuged and the supernatant corresponded to the Cell-Wall Extract (CWE). SE e CWE from the three development states were fractionated (ammonium sulfate and heating), desalted, lyophilized and separated by anionic-exchange chromatography (DEAE-Sepharose-FPLC). They were obtained two cationic (CP1 e CP2) and one anionic (AP) peaks to each evaluated-stage, that were submitted to growth-inhibition tests of the two plant pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* growth. The results indicated a

best inhibition rate by CWE of young plants (5 cm), while the SE from mature plants (15 cm and leaf) was more effective. SE from expanded-leaves were submitted to an anionic-exchange chromatography in Q-Sepharose-FPLC and the five obtained *pools* were submitted to antibacterial tests, and PC1 was submitted to an inactivation- or death-tests of plant nematodes. PC1 were selected as a promise to AMPs bioprospection, because it shown an antimicrobial effect against the two evaluated bacteria, and a nematicide effect against the nematode *Meloidogyne incognita*, and it was then separated by a C18-RP-HPLC. From all collected peaks, twelve were analyzed by mass spectrometry and two of them (peaks 18 and 24) presented peptides with mass from 2 and 9 kDa. The remaining-ES and -EP of expanded-leaves were separated in a Sephadex G-10 column. They were obtained four *pools* for each ES- and EP-separations, that were submitted to antimicrobial tests *in vitro* against the two plant pathogenic bacteria above mentioned, and *in vivo* against *Ralstonia solanacearum* infection in tomato plant. Some *pools* showed as a promise, especially the ES-pool 1 obtained by the separation in the Sephadex G-10 column, from that two fractions were separated in a C18-RP-HPLC column, and the recovered peaks were submitted to develop mass spectrometry analysis. They were found molecules with molecular mass in the peptide range. The amino acidic sequences of the peptides present in the fractions corresponding to the peaks 9 and 14 were determinated, and they need to be confirmed. The others peptide peaks will be submitted to mass spectrometry analysis, amino acidic sequencing, and antimicrobial tests, aiming to select effective peptides against plant pathogens that are of interest in the agribusiness.

1. INTRODUÇÃO

A produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) por diferentes organismos corresponde a uma estratégia de defesa antiga, eficiente e econômica para o organismo, pois são sintetizados com um baixo consumo de energia e biomassa. Um mesmo organismo pode produzir diferentes classes de peptídeos, com diferentes especificidades de ação antimicrobiana, e que ainda possuem outras atividades biológicas complementares à atividade antimicrobiana.

Até o momento, dez famílias de AMPs foram identificadas em plantas como componentes da barreira de defesa constitutiva ou induzida sob situações de estresse. A maioria atua em concentrações micromolares, e vêm sendo identificados em camadas celulares periféricas de sementes e de tecidos vegetativos, localização que está de acordo com sua função de defesa primária de tecidos vulneráveis. Os peptídeos da família das defensinas de plantas são os mais bem caracterizados e mostram pouca conservação de seqüência entre as diversas defensinas, exceto em oito resíduos de cisteínas, dois resíduos de glicina e um resíduo de glutamato, e alguns poucos resíduos de consenso entre esta família.

Os produtos naturais representam uma rica fonte de compostos a serem explorados na seleção de novos defensivos agrícolas para plantas e como suas principais características podem-se citar a baixa toxicidade para humanos e para a vida selvagem, o baixo impacto ambiental, a presença de baixa quantidade de resíduos em alimentos e a compatibilidade com o manejo integrado de pragas.

O aparecimento de linhagens de bactérias multi-resistentes nos anos 80 demonstrou a necessidade da pesquisa por diferentes alternativas de antibióticos sintéticos. Hoje, antibióticos baseados em peptídeos são amplamente considerados como uma potencial resposta para o crescente problema da resistência para antibióticos convencionais. Recentes estudos mostraram que vários peptídeos catiônicos e não catiônicos são expressos em muitas espécies de vertebrados e invertebrados, e é possível que eles atuem em sinergismo para melhorar a resposta imune contra patógenos. Assim alguns peptídeos antimicrobianos vêm também sendo avaliados como agentes terapêuticos para animais e humanos, à semelhança

dos antibióticos em uso. Entretanto, pouco se conhece sobre sua forma de penetração, toxicidade potencial e custo de produção. Esses peptídeos têm atraído o interesse de pequenas companhias farmacêuticas e biotecnológicas no mundo, objetivando a produção de agentes de defesa tópicos e de amplo espectro a serem comercializados.

O mecanismo de ação das defensinas vegetais, bem como de outros peptídios com atividade antimicrobiana, ainda não é completamente entendido, embora vários estudos indiquem que a ação de peptídios ocorre no geral por alteração da permeabilidade de membranas. Acredita-se que a atividade antimicrobiana e a seletividade dos peptídios sejam determinadas pelo modo de interação dessas moléculas com as membranas celulares dos microrganismos.

Há grandes perdas nas culturas agrícolas de importância comercial causadas por diferentes patógenos, mesmo com a utilização das práticas de proteção disponíveis. Os plantios comerciais de tomate, por exemplo, são atacados por diversos fitopatógenos de difícil controle. As estimativas atuais para as perdas nessa cultura, causadas por patógenos, chegam a 14% mesmo com a utilização das práticas de proteção químicas disponíveis. Plantas de berinjela de algumas variedades são não-hospedeiras de alguns fungos patogênicos de tomateiros de importância comercial, possivelmente também por expressarem compostos naturais de defesa contra esses fitopatógenos. Assim, foi objetivo dessa investigação identificar AMPs extraídos de plântulas e folhas de berinjela que sejam efetivos contra fitopatógenos de tomateiros, visando à produção futura de defensivos agrícolas ou a transferência desses genes de resistência para os tomateiros, produzindo plantas de tomate resistentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Peptídeos antimicrobianos

A maioria dos organismos vivos é constantemente exposta a patógenos potencialmente prejudiciais, seja por contato, ingestão ou inalação (Hultmark, 2003). A sobrevivência desses organismos depende de uma rede de mecanismos de defesa que envolvem vários componentes (Bals, 2000). A síntese de imunoglobulinas direcionadas contra microrganismos específicos é o mais sofisticado dos mecanismos de defesa conhecidos, sendo característica dos animais vertebrados (Broekaert *et al.*, 1995; Taylor, 1998). Contrastando com esses mecanismos imunes adquiridos, peptídeos endógenos, que são constitutivamente expressos ou induzidos por infecção, provêm um rápido e efetivo meio de defesa contra patógenos (Reddy, 2004). Esse grupo de moléculas chamadas peptídeos antimicrobianos (AMPs) constitui um mecanismo de defesa primitivo, e são encontrados desde nos organismos simples, como bactérias, até nos organismos mais complexos, como animais, incluindo-se os humanos (Ostberg, 2005). A diversidade de AMPs é muito grande. Atualmente, cerca de 1000 diferentes peptídeos antimicrobianos foram identificados (Bechinger, 2006; Straus e Hancock, 2006).

Esses peptídeos são, em sua maioria, menores que 10 kDa, têm carga líquida positiva, e 50% de seus aminoácidos são hidrofóbicos (Hancock *et al.*, 2000). Os AMPs descobertos têm sido divididos em vários grupos baseados em seu tamanho, estrutura secundária e terciária, e na presença ou ausência de pontes dissulfeto (Reddy *et al.*, 2004). Eles podem ser prontamente sintetizados de uma maneira flexível e com um baixo consumo de energia e de biomassa, em função do seu pequeno tamanho (Broekaert *et al.*, 1995). Muitos são sintetizados ou ativados por proteólise a partir de proteínas específicas (Borregaard *et al.*, 2000). Alguns peptídeos têm suas estruturas secundária e terciária pré-formadas em solução livre, mais comumente aqueles que possuem de duas a quatro ligações dissulfeto, estabilizando predominantemente estruturas em folhas β ou grampos β . Por outro lado, um grande número de peptídeos tem um pequeno ou mesmo nenhuma

estrutura pré-definida em solução livre, dobrando-se em uma estrutura anfipática quando em contato com a membrana alvo (Powers e Hancock, 2003).

Nas últimas duas décadas, AMPs têm sido reconhecidos potencialmente como grandes agentes terapêuticos no combate a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, além de exercerem outras atividades. Alguns AMPs têm apresentado características antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anti-cancerígenas e de cicatrização de feridas (Hancock *et al.*, 2003). Muitos AMPs apresentam um amplo espectro de ação contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e envelopes viróticos (Thevissen *et al.*, 1996). Como os AMPs diferem estruturalmente dos antibióticos convencionais produzidos por bactérias e fungos, eles oferecem novos moldes para o desenvolvimento de compostos farmacêuticos efetivos contra os patógenos resistentes. Em muitos exemplos, esses peptídeos são efetivos contra microrganismos resistentes a antibióticos ou fungicidas (Muñoz *et al.*, 2007).

2.2. Classificação dos peptídeos antimicrobianos

AMPs de várias espécies diferem amplamente no tamanho, na composição de aminoácidos e no padrão de enovelamento (Thevissen *et al.*, 2000), que são reflexos das diferenças na sua seqüência primária, seja por mudanças nas posições dos resíduos ou número de ligações dissulfeto e número de resíduos de aminoácidos constituintes. Uma análise do perfil de atividade biológica destes peptídeos indicou que existe alta variabilidade, não sendo fácil generalizar sua classificação com base no comprimento de cadeia, carga e presença ou ausência de ligações dissulfeto (Hancock *et al.*, 2002). Muitos desses peptídeos possuem ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas, fungos, vírus ou protozoários (Thevissen *et al.*, 1996).

Uma das classes de AMPs corresponde a pequenos peptídeos lineares (20 a 40 resíduos de aminoácidos) que formam α -hélice anfipática. Esses peptídeos se associam aos lipídios da membrana das células-alvo, formando poros. Esta classe é bem representada pelas cecropinas, presentes nas hemolinfas de muitos invertebrados em respostas a injúrias ou infecções, e pelas magaininas, secretadas

por glândulas da pele de anfíbios (Broekaert *et al.*, 1997). Os peptídeos lineares também podem ser ricos em um determinado tipo de aminoácido, tais como prolina, histidina e triptofano, tendo como exemplo, a indolicidina bovina (Rozek *et al.*, 2000).

Uma segunda classe de AMPs é formada pelos peptídeos ricos em cisteína, que apresentam um padrão de estrutura tridimensional complexa estabilizado por cisteínas, predominando estruturas folhas β antiparalelas. Esta numerosa classe envolve peptídeos diferindo no comprimento, número de cisteínas, número de ligações dissulfeto ou padrão de enovelamento (Boman, 1995).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos isolados contém quatro, seis ou oito cisteínas, apresentando pontes dissulfeto, o que lhes confere alta estabilidade. Embora pouco estudados, esses peptídeos aparentam exercer efeito antimicrobiano em membrana plasmática (Broekaert *et al.*, 1997).

Todos os peptídeos antimicrobianos conhecidos são derivados de grandes precursores, incluindo uma seqüência sinal. Modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico e, em alguns casos, glicosilação (Bulet *et al.*, 1993), isomerização aminoacídica (Simmaco *et al.*, 1998) amidação carboxi-terminal, e halogenação são importantes para o rearranjo final dos peptídeos (Shinnar *et al.*, 1996; Simmaco *et al.*, 1998; Zasloff, 2002). Um padrão complexo de modificações envolve a ciclização de dois pequenos peptídeos, levando à formação de um peptídeo completamente circular, como a α -defensina isolada de neutrófilos de macaco *Rhesus* (Tang *et al.*, 1999). Alguns peptídeos são originados por proteólise de grandes proteínas, como a buforina II, originada da histona 2A, e a lactoferrina, originada da lactoferrina (Kim *et al.*, 2000; Ulvatne e Vorland, 2000; Zasloff, 2002).

2.3. Peptídeos antimicrobianos na defesa de plantas

Plantas produzem um ampla gama de proteínas antimicrobianas para se defender de fitopatógenos (Thevissen *et al.*, 2005). A superexpressão de alguns peptídeos promove aumento na tolerância das plantas a patógenos e, ainda, patógenos mutantes sensíveis aos peptídeos apresentam virulência significativamente menor nos tecidos em que os peptídeos aparecem (Titarenko *et al.*, 1997; López-Solanilla *et al.*, 1998; Garcia-Olmedo *et al.*, 2001). Observações

relativas à tioninas, defensinas e proteínas de transferência de lipídios (LTPs) são consistentes com a hipótese de defesa (García-Olmedo *et al.*, 2001). A maior expressão da tionina endógena em *Arabidopsis thaliana* aumentou sua resistência contra *Fusarium oxysporum* (Epple *et al.*, 1997) e *Plasmodiophora brassicae* (Holtorf *et al.*, 1998).

Os AMPs são de grande importância na defesa de plantas como parte da barreira constitutiva pré-existente, e também como resposta induzida por infecção, e podem interagir um com o outro de forma aditiva, sinérgica ou antagonística (García-Olmedo *et al.*, 1998; 2001).

Dez grupos de peptídeos de defesa foram identificados em plantas (García-Olmedo *et al.*, 1998; 2001), e muitos são caracterizados como catiónicos, ricos em cisteína, órgão-específicos e contêm até 50 % de resíduos hidrofóbicos, os quais podem facilmente interagir com membranas (Hancock *et al.*, 1998; 2002). Significantes progressos vêm sendo obtidos na utilização desses peptídeos na área de proteção vegetal (Rao, 1998), incluindo a produção de componentes protetores e a engenharia genética de plantas, produzindo moléculas com total ou parcial resistência contra fitopatógenos (Mouragues *et al.*, 1998; Morassutti *et al.*, 2002).

De acordo com sua estrutura, várias classes de AMPs, ricos em cisteína, com 6 ou 8 resíduos envolvidos em pontes dissulfeto, têm sido identificadas em plantas: tioninas, defensinas, proteínas de transferência de lipídios (LTPs), peptídeos semelhantes-à-*heveína*, peptídeos semelhantes a nós, MBP1, IbAMP, snakinas, sheferdinas e peptídeos macrocíclicos (Broekart *et al.*, 1997; García-Olmedo *et al.*, 1998; Goransson *et al.*, 1999). Entretanto, alguns outros AMPs, que não estão incluídos nas classes acima, como o MBP-1 de milho, com 4 cisteínas (Duvick *et al.*, 1992) e o Ib-AMP de *Impatiens balsamina* (Tailor *et al.*, 1997), com 4 resíduos de cisteínas, e as Snakinas de tomate com 12 cisteínas, têm sido relatados (Segura *et al.*, 1999; Berrocal *et al.*, 2002). O único exemplo, até o momento relatado, de AMPs lineares sem resíduos de cisteína em plantas são as sheferdinas de raízes de *Capsella bursa-pastoris* (Park *et al.*, 2000).

Somente a classe das defensinas parece ser conservada entre plantas, invertebrados e vertebrados (Thomma *et al.*, 2002). As defensinas foram inicialmente

caracterizadas em plantas por Terras *et al.* (1995) e apresentam propriedades estruturais e funcionais semelhantes às das defensinas de insetos e de mamíferos. Estes peptídeos, obtidos a partir de grãos de trigo e cevada, foram inicialmente chamados γ -tioninas por apresentarem tamanho de 5 kDa e quatro ligações dissulfeto, assim como as α - e β -tioninas (Broekaert *et al.*, 1995). Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que as defensinas não são relacionadas estruturalmente às α - e β -tioninas, conforme caracterizadas anteriormente por diversos autores (Terras *et al.*, 1992; Bruix *et al.*, 1993; Bohlmann, 1994). As defensinas de plantas, possuem de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, apresentam clara e limitada conservação na seqüência de aminoácidos, centrado-se em oito resíduos de cisteína, dois resíduos de glicina (posições 13 e 34), um resíduo aromático (posição 11) e um de ácido glutâmico (posição 29) (numerações relativas à defensina 1 de rabanete – Rs-AFP1, descrita por Terras *et al.* (1992) (Broekaert *et al.*, 1995). Todos os membros conhecidos desta família possuem quatro ligações dissulfeto e são enovelados de forma globular, contendo três estruturas folhas β antiparalelas e uma α -hélice em paralelo às folhas β (Bruix *et al.*, 1993; Thevissen *et al.*, 1996, Almeida *et al.*, 2002). A estrutura tridimensional das defensinas de plantas assemelha-se muito à estrutura de defensinas de insetos, exceto que estas últimas não possuem o domínio folha β -amino terminal que está presente nas defensinas de plantas (Figura 1) (Broekaert *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1998). As defensinas de mamíferos, em comparação com as de plantas, apresentam apenas as três estruturas folhas β antiparalelas, não apresentando a estrutura α -hélice (defensinas humana classe α) (Figura 1) (Broekaert *et al.*, 1995). Porém, a análise estrutural de duas defensinas humana da classe β , β -defensina HBD-1 e HBD-2, revelaram que estas defensinas formam uma α -hélice com uma tripla folha β anti-paralela. Entretanto, seu enovelamento global difere das α - defensinas de plantas (Broekaert *et al.*, 1995), pois sua α -hélice encontra-se na porção N-terminal do peptídeo (Hoover *et al.* 2000; 2001; Sawai *et al.*, 2001).

Avaliando-se a diversidade de AMPs de origem vegetal e sua função de defesa na planta, vários aspectos devem ser considerados como a atividade antimicrobiana *in vitro*, a distribuição do peptídeo, a concentração do peptídeo no

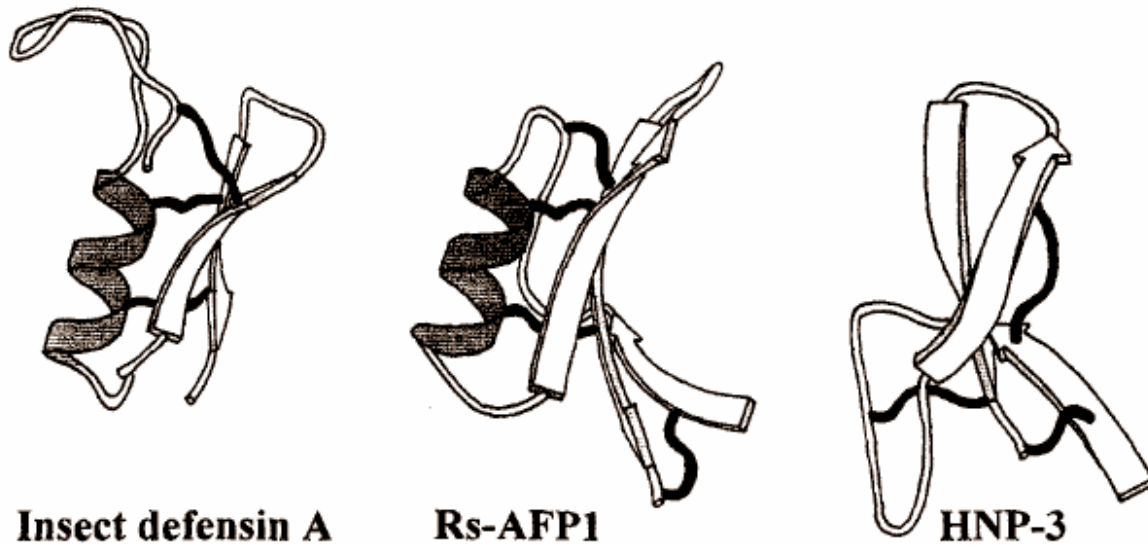


Figura 1 - Representação esquemática de uma estrutura tridimensional de uma defensina de insetos (Insect defensin A; Bonmatin *et al.*, 1992), de uma defensina de plantas (Rs-AFP1; Fant *et al.*, 1994), e de uma defensina de mamíferos (HNP-3; Hill *et al.*, 1991) (Broekaert *et al.*, 1995)

plasma antes e após a infecção, a expressão gênica e correlações entre nível de expressão e controle de sintomas ou diferenças de resistência dos patógenos aos peptídeos em relação à virulência. Um progresso considerável tem sido alcançado na identificação de peptídeos antimicrobianos em plantas com base nestes critérios (García-Olmedo *et al.*, 1998).

2.4. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos

O modo de ação dos AMPs ainda não é completamente entendido. Muitos esforços têm sido realizados no sentido de se elucidar quais mecanismos de resistência são utilizados pelas plantas para se defenderem ou para evitarem o ataque por parte de seus agressores (Harbone, 1982; Cornelissen e Melchers, 1993; Papagianni, 2003; Hancock, 2005; Straus e Hancock, 2006).

Vários autores relataram que a ação dos AMPs ocorre, em geral, por alteração da permeabilidade das membranas biológicas (Liang e Kim, 1999; Papagianni, 2003; Hancock, 2003). Apesar da diversidade das seqüências de aminoácidos e das diferentes classes estruturais os AMPs, com cerca de 1000 conhecidos até o momento (Bechinger, 2006; Straus e Hancock, 2006), eles possuem um arranjo

tridimensional comum. Se dobram em moléculas anfifílicas, com uma face hidrofóbica, enquanto a outra é carregada (Hancock, 2005) facilitando a interação com a membrana alvo.

A morte de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas está ligada à formação de canais na membrana citoplasmática (Liang e Kim, 1999). Tendo a integridade da membrana destruída, a célula morre (Liang e Kim, 1999; Zasloff, 2002). Diferentes modelos têm sido propostos para explicar a formação de canais na membrana provocada pelos AMPs (Wu *et al.*, 1999; Hancock, 1999). A conveniência de cada modelo depende do peptídeo (Buffy *et al.*, 2004; Porcelli *et al.*, 2004), como também das propriedades dos lipídios, ou seja, fluidez, hidrofobicidade, carga líquida de membrana, o comprimento da cadeia (Hallock *et al.*, 2002; Dave *et al.*, 2005).

A capacidade de formar canais é favorecida pelo grande potencial da membrana, pelo alto nível de lipídios negativamente carregados, pela ausência de lipídeos catiônicos e colesterol, cujas ausências são características da célula bacteriana. As células eucarióticas, por outro lado, têm baixo potencial de membrana, altos níveis de colesterol e uma quantidade modesta de lipídeos aniônicos (Zasloff, 2002), o que torna o peptídeo específico para a ação contra procariontes.

A especificidade na interação dos peptídeos com as membranas gera diferenças em sua eficácia. Muitos AMPs podem interagir com os fosfolipídeos da monocamada lipídica externa dos microrganismos e podem formar canais, lisar as células ou penetrar na célula para efetuar sua ação (Zasloff, 2002). Interações entre peptídeos bioativos e membranas celulares é um importante passo na ocorrência de muitos processos celulares (Papo, 2003). Os fatores determinantes dos mecanismos antimicrobianos desses peptídeos estão relacionados às características das membranas das células microbianas e à natureza físico-química do peptídeo. Acredita-se que a atividade antimicrobiana e a seletividade dos peptídeos sejam determinadas pelo modo de interação dessas moléculas com as membranas celulares dos microrganismos (Liang e Kim, 1999).

As diferentes classes de AMPs vegetais descritas (García-Olmedo *et al.*, 2001) apresentam especificidades variadas quanto ao efeito inibitório de bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas ou de fungos. Alguns peptídeos são específicos para bactérias Gram-positivas porque não possuem a capacidade de criar um sistema de transporte próprio, necessário para a atividade bactericida contra Gram-negativas (Cristensen *et al.*, 1988; Tejada *et al.*, 1995).

As lipoproteínas e os fosfolipídios aniônicos que compõem o lado externo da membrana celular estão em equilíbrio com cátions divalentes de cálcio e magnésio. Peptídeos antimicrobianos catiônicos (cAMPs) são mostrados como tendo grande afinidade pelos fosfolipídeos ou por lipopolissacarídeos de membrana, substituindo os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (Hancock, 1999). Além disso, os peptídeos podem criar poros na membrana citoplasmática e causar a ruptura, resultando na lise celular (Vogel, 1999; Hancock, 2003). Alternativamente, os AMPs podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica de sua função. Ainda, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microorganismo. Um exemplo seria o peptídeo PP-39, que mata a bactéria por um mecanismo não lítico. Ele inibe a síntese de proteínas requeridas para a replicação do DNA (Tossi e Giangaspero, 2000). Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses compostos tornam-se candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Lohner, 2001).

O mecanismo de ação dos peptídeos vegetais com atividade antimicrobiana, bem como de outros, ainda não é completamente entendido, embora vários estudos indiquem que a ação de peptídeos ocorra no geral por alteração da permeabilidade de membranas. As defensinas Rs-AFP2 de semente de rabanete (*Raphanus sativus*) (Terras *et al.*, 1992) e a defensina Dm-AMP1, de semente de dália (*Dahlia merckii*) (Osborn *et al.*, 1995), induziram um rápido influxo de Ca^{2+} , efluxo de K^+ e alcalinização do meio de incubação quando adicionadas a hifas do fungo *Neurospora crassa*. A alcalinização do meio de incubação induzida por Rs-AFP2 foi inibida por inibidores de proteína-G (Thevissen *et al.* 1996, 2000). Além disso, estes autores observaram que, embora estruturalmente semelhantes às tioninas, estas defensinas de plantas não causavam a formação de poros permeáveis a íons em membranas

artificiais e não apresentavam significativa atividade de permeabilização de membranas de hifas.

2.5. Localização celular de peptídeos antimicrobianos

Sugere-se que os AMPs sejam ubíquos no reino vegetal. Esses peptídeos vêm sendo encontrados em diferentes espécies de plantas e em vários tecidos e órgãos como sementes, flores e folhas atacadas por patógenos.

A infecção de sementes ou de plantas, originada durante a germinação, ocorre geralmente com frequência relativamente baixa, mesmo estando estas depositadas em substratos ricos em microrganismos (Cammue *et al.*, 1995).

Apesar de muitos peptídeos terem sido isolados de sementes, existe hoje evidências de que estes peptídeos também ocorrem em tecidos vegetativos. Muitos AMPs são preferencialmente expressos em camadas celulares periféricas, tendo sido encontrados no xilema, em células estomáticas e em células que ocupam a cavidade subestomática (García-Olmedo *et al.*, 1998).

Estes peptídeos parecem ser expressos de maneira constitutiva ou órgão-específica, ou ainda ser expressos de maneira modulada por patógenos, possivelmente com uma expressão com especificidade alterada para cada tecido (Broekaert *et al.*, 1995).

2.6. Patógenos de Plantas

Bactérias do gênero *Clavibacter* correspondem a patógenos de planta Gram-positivos, actinomicetos (família *Microbacteriaceae*) (Stackebrandt *et al.*, 1997), e são representadas por uma simples espécie, *C. michiganensis*. Esta espécie é subdividida em cinco subespécies, de acordo com seus hospedeiros (Jahr *et al.*, 1999). Essas bactérias presentes no solo invadem o sistema vascular das plantas e colonizam os plasmodesmas (Gaterman, 2003). A bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pode ser considerada o patógeno causador de uma das doença que mais lesa tomateiros, o cancro bacteriano, além de lesar outras espécies de importância comercial, causando considerável prejuízo econômico aos agricultores (Strider, 1969; Davis *et al.*, 1984; Gaterman, 2003).

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* tem sido um fator limitante da produção de diversas solanáceas em todo o mundo (Syed e Loke, 1995). Mais de 100 espécies já foram relatadas como suscetíveis a esta bactéria Gram-negativa, que está presente no solo, invade e coloniza a raiz das plantas hospedeiras, seguindo-se uma rápida colonização nos tecidos vasculares (Hayard, 1991).

Pela comprovada importância como fitopatógenos que causam danos irreversíveis a espécies de grande importância comercial, optou-se por utilizar essas bactérias como microrganismos-teste na identificação da atividade antimicrobiana dos extratos enriquecidos em peptídeos, obtidos de folhas e plântulas de berinjela da espécie em estudo.

Os nematóides do gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematóides das galhas, são considerados os mais importantes (Sasser e Frekman, 1987), pois são parasitas de mais de 2000 espécies de plantas e sua extensa gama de hospedeiros inclui plantas monocotiledoneas e dicotiledoneas, plantas herbáceas e lenhosas (Hussey, 1985). Eles são responsáveis por grandes perdas em culturas agrícolas em todo o mundo (Kiewnick, 2006). Esse gênero por ser o mais prejudicial à agricultura, causa uma perda estimada em US\$100 bilhões por ano (Oka *et al.*, 2000).

O controle de nematóides é muito complexo. O uso de nematicidas químicos é uma das primeiras formas de tentativa de controle desses parasitas de plantas (Khan, 2007). Entretanto, seus potenciais impactos negativos causados ao homem e ao meio ambiente conduziu a uma proibição total ou ao uso restrito da maioria dos nematicidas (Zuckerman e Esnard, 1994; Nico *et al.*, 2004). Várias opções são atualmente avaliadas em todo o mundo para identificar e desenvolver opções ecologicamente sustentáveis para controlar os fitonematóides (Khan, 2007). Dentre essas opções estão o controle biológico, o uso de plantas antagonicas e de extratos de diferentes espécies e partes de plantas.

Algumas plantas têm apresentado um grande potencial como matéria prima para a produção de nematicidas naturais. Há vários relatos, na literatura, do efeito de extratos botânicos sobre os fitonematóides (Lewis e Papavizas, 1971; Mayton, *et al.*,

1996; Lazzeri *et al.*, 1993; Ferris e Zheng, 1999). Extratos botânicos apresentam vantagens sobre pesticidas sintéticos, como a possibilidade de gerar novos compostos que os patógenos ainda não se tornaram capazes de inativar, serem menos concentrados e conseqüentemente menos tóxicos, serem biodegradados rapidamente, possuir um amplo modo de ação e serem derivados de recursos renováveis (Quarles 1992).

2.7. Aplicações futuras do conhecimento sobre peptídeos vegetais

Os AMPs apresentam potencial considerável para uma variedade de aplicações terapêuticas para diferentes organismos (Aumelas *et al.*, 1996). Com a descoberta das diferentes classes estruturais de peptídeos antimicrobianos, incluindo-se as defensinas, em diversos tipos de organismos, cresce o otimismo de que alguns destes compostos possam ser empregados em terapias de humanos (Ganz e Lehrer, 1999; Marr *et al.*, 2006).

Broekaert *et al.* (1997) sugerem que as defensinas vegetais, dentre outros AMPs, desempenham função importante na proteção de tecidos de plantas durante o estágio inicial de emergência, o que contribui fortemente para o aumento das taxas de sobrevivência das plantas após a germinação. Essa hipótese é baseada na observação de que sementes de rabanete germinando em um meio que permite o crescimento de fungos houve a formação de um halo de inibição do crescimento que pode ser observado também quando aplicou-se 1 µg de defensina purificada de rabanete, Rs-AFP1 e Rs-AFP2.

Estima-se que as perdas causadas por ação de fitopatógenos em todo o mundo alcance 20% da produção de alimentos e dos lucros econômicos dos agricultores (Rommens e Kishore, 2000). Os fungicidas são, hoje em dia, essenciais para o efetivo controle de doenças de plantas, seja na cobertura de sementes visando aumentar a sobrevivência das plantas recém germinadas (Broekaert *et al.*, 1995) ou em fase mais adiantada de cultivo. Há uma longa tradição no uso de fungicidas e inseticidas para o controle de pragas. Entretanto, a alta freqüência de aplicação desses defensivos tem, frequentemente, resultado na emergência de pragas resistentes ao princípio ativo. O único caminho para prevenir ou retardar o

aparecimento da resistência é desenvolver compostos com outros modos de ação e usar estratégias de controle de pragas que incluam a proteção de organismos benéficos (Oerke, 2006). A busca por AMPs estimula essa prospecção de novas classes de moléculas naturais e/ou sintéticas, capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo inibindo assim o desenvolvimento da resistência (Heinemann *et al.*, 2000). O amplo espectro de ação e a não-toxicidade para células de mamíferos de alguns peptídeos vegetais (Terras *et al.*, 1992; 1993; 1995; Moreno *et al.*, 1994; Osborn *et al.*, 1995) deixam os cientistas otimistas, pois sinalizam para a produção de bactérias ou plantas geneticamente modificadas que poderão ser utilizadas como biorreatores para a produção de agentes antimicrobianos ou antibióticos em grande escala, visando o uso como defensivos agrícolas naturais ou agentes terapêuticos para animais.

Desde a descoberta dos AMPs, os investigadores estão esperançosos que eles possam ajudar a resolver o problema de bactérias que se tornaram resistentes a antibióticos comuns. Muitos dos antibióticos usados atualmente possibilitam essa resistência porque eles executam sua função em uma porção muito específica das bactérias. Como resultado, mudanças minuciosas no alvo do antibiótico são suficientes para impedir a droga de ser efetiva (Chan, 2006). Por exemplo, uma mutação em um aminoácido na subunidade ribossomal 12S de *Mycobacterium tuberculosis* resulta na resistência contra estreptomicina (Finken *et al.*, 1993). Portanto, nunca foi tão crucial como agora descobrir novos agentes antimicrobianos. Os AMPs podem ser usados para reverter essas tendências (Chan *et al.*, 2006). Considerando que eles foram prosperamente usados na natureza por milhões de anos e ainda são altamente efetivos atualmente, eles são muito promissores. Embora já tenham sido descritos alguns mecanismos de resistência aos AMPs, eles envolvem mudanças principalmente na composição da membrana para alterar a carga e então interferir na associação do peptídeo, ou são mecanismos altamente específicos que não são aplicáveis a um número grande de peptídeos antimicrobianos (Brogden, 2005). Além disso, a maioria dos mecanismos de resistência encontrados só provocaram um moderado aumento na concentração inibitória mínima (MIC), cerca de 2 a 4 vezes (Hancock, 2001). Um grande número

de estudos tem mostrado que peptídeos antimicrobianos atuam em sinergismo com os antibióticos atualmente utilizados podendo atuar contra bactérias multiresistentes, melhorando a potência dos antibióticos (Giacometti *et al.*, 2005). Conseqüentemente, essas moléculas são de grande interesse como uma nova classe de agentes de antimicrobianos.

Um maior conhecimento sobre o conjunto dos peptídeos antimicrobianos em plantas e sobre seus mecanismos de ação permitirá o seqüenciamento destes peptídeos e a identificação dos genes envolvidos em suas sínteses, auxiliando programas futuros de manipulações gênicas em plantas susceptíveis a doenças específicas, tornando-as resistentes a estes patógenos, como podemos citar os organismos transgênicos (Knight *et al.*, 1997).

Considerando a importância dos AMPs como possíveis princípios ativos para o desenvolvimento de agentes de defesa tanto com aplicações farmacêuticas quanto para o desenvolvimento de novas classes de defensivos para a agroindústria o objetivo desse trabalho visou detectar, extrair, purificar formas de AMPs presentes em plantas jovens e folhas totalmente expandidas de berinjela, e avaliar a ação desses peptídeos *in vitro* e *in vivo* contra fitopatógenos de diversas espécies vegetais, visando posterior clonagem e expressão heteróloga para caracterização estrutural das moléculas. O trabalho teve como objetivo explorar o potencial antimicrobiano dos extratos parcialmente purificados, obtidos de folhas totalmente expandidas de berinjela, visando possível aplicação no controle de fitopatógenos. O conhecimento gerado será utilizado para desenvolver defensivos naturais para plantas e identificar agentes terapêuticos para animais, e ainda produzir plantas de tomate modificadas resistentes aos fitopatógenos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal: Plantio das Sementes de Berinjela e Coleta das Folhas e Plântulas

Plantas de berinjela (*Solanum melongena*) da variedade “Florida Market” foram cultivadas em sistema hidropônico desenvolvido pelo Prof. Paulo Roberto Gomes Pereira do Departamento de Fitotecnia (DFT) da UFV, em presença de solução nutritiva completa. As sementes da variedade “Florida Market” foram obtidas do Banco de Germoplasma de Hortalças da UFV, e fornecidas pelo Prof. Derly José Henriques da Silva (DFT).

A copos descartáveis de 200 mL, com furos na porção inferior, foram adicionados o substrato BIOPLANT e receberam sementes de berinjela. Esses copos foram colocados sobre uma bandeja de isopor contendo o mesmo substrato, sendo essa bandeja irrigada com água duas vezes ao dia. As plantas de berinjela foram mantidas em ambiente de casa-de-vegetação aclimatada, do BIOAGRO na UFV.

Foram coletadas folhas totalmente expandidas de plantas com cerca de 60 dias. Esse material foi lavado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C em ultrafreezer, em envelopes de papel alumínio que foram colocados dentro de envelopes de papel pardo, até a utilização como fonte de peptídeos.

Paralelamente, plantas jovens de berinjela da mesma variedade com 5 e 15 cm de altura, cultivadas sob as mesmas condições foram coletadas integralmente (raiz e parte aérea), lavadas e armazenadas à semelhança das folhas totalmente expandidas.

3.2. Microrganismos

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos, as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum*, Gram-negativa, e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Gram-positiva, foram fornecidas pelo Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, do Departamento de Fitopatologia da UFV, responsável pelo Banco de Fitopatógenos do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico. Culturas estoque das bactérias *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foram

preparadas em meio líquido (meio LB) contendo glicerol 50 % e armazenadas a -80°C . Para os testes, as bactérias foram repicadas em meio líquido e cultivadas até A_{560} de 1,0 –1,2.

O fitonematóide utilizado para avaliar a atividade nematostática ou nematicida dos extratos enriquecidos foi o *Meloidogyne incognita*, fornecido pelo Prof. Leandro Grassi de Freitas, do Departamento de Fitopatologia da UFV. Ovos de *Meloidogyne incognita* foram obtidos à partir do tomateiro Santa Cruz 'Kada' infectado, mantido em casa de vegetação, e extraídos conforme a metodologia proposta por Hussey e Barker (1973). Para a obtenção de juvenis de segundo estágio os ovos foram colocados em funis de Baermann (1917) e mantidos em câmara de crescimento a 28°C .

3.3. Obtenção de Extrato Solúvel Bruto

A extração dos peptídeos de plantas jovens e de folhas totalmente expandidas de berinjela foi realizada conforme Teixeira *et al.* (2006). O material vegetal congelado, após pesado, foi triturado com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo, macerado na proporção 1:4 com tampão Tris-HCl 0,1 M contendo EDTA 10 mM, benzamidina 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM e tiouréia 2 mM. O homogenato obtido foi centrifugado a $20.300g$ e 4°C por 30 minutos em centrífuga refrigerada, condição utilizada para todos os procedimentos de centrifugação. O sobrenadante foi reservado, e o precipitado lavado duas vezes em volume igual ao inicial com água ultrapura (Milli-Q). Após nova centrifugação os dois sobrenadantes obtidos foram associados ao anteriormente reservado para formar o Extrato Solúvel Bruto (ESB).

3.4. Obtenção do Extrato de Parede Celular Bruto

O precipitado obtido na etapa anterior foi ressuspendido em cloreto de lítio 1,5 M contendo benzamidina 1 mM, PMSF 1mM e tiouréia 2 mM, mantido sob agitação a 4°C , por 2 h, e a seguir, centrifugado sob as mesmas condições descritas. O precipitado foi descartado e o sobrenadante correspondeu ao Extrato de Parede Celular Bruto (EPB).

3.5. Purificação Parcial dos Peptídeos

3.5.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio

Ambos os extratos, ESB e EPB, foram fracionados com sulfato de amônio sólido a 35 % de saturação, em banho de gelo, sob agitação branda por 2 h a 4 °C. Em seguida, foram novamente centrifugados e os sobrenadantes foram recuperados.

3.5.2. Aquecimento Seletivo

Os sobrenadantes recuperados foram separadamente submetidos a um aquecimento seletivo a 80 °C por 15 min, em banho-maria. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes obtidos foram denominados Extrato Solúvel (ES) e Extrato de Parede Celular (EP). Os sobrenadantes foram dialisados contra água Milli Q e concentrados em membranas de filtração de 1.000 Da, em equipamento de filtração positiva do tipo AMICON/MILLIPORE.

3.5.3. Cromatografias de Troca Iônica em equipamento tipo FPLC

ES e EP foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose (8 mL) em equipamento tipo FPLC, Biologic Workstation (BioRad). Utilizou-se como tampão de equilíbrio Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e o mesmo tampão adicionado de NaCl 1M foi utilizado para eluição das proteínas. A cromatografia foi desenvolvida a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A amostra correspondeu a 7 mL de ES ou EP após diálise, liofilização e ressuspensão em água Milli Q. As amostras eluídas foram recuperadas em microtubos utilizando-se um coletor de frações acoplado ao equipamento.

Em estratégias posteriores de purificação, ES foi submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna com resina Q-Sepharose (36 mL), sob as mesmas condições acima descritas. Esse procedimento teve o objetivo de melhorar a separação, pois a resina Q-Sepharose possui uma amina quaternária, como grupo trocador aniônico, mais forte que o grupo dietil-amino-etil da resina DEAE-Sepharose.

Com o objetivo de separar o grupo de proteínas aniônicas dos compostos fenólicos presentes no extrato, o *pool* de proteínas ácidas recuperado da cromatografia de troca aniônica foi submetido à cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose FF. A coluna foi equilibrada com tampão MES 25 mM, pH 6,0. Para a eluição das proteínas ligadas à coluna esse tampão foi acrescido de 1 M de NaCl. A corrida foi realizada a um fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As cromatografias foram monitoradas automaticamente pelos valores de A_{280} em equipamento do tipo FPLC.

3.5.4. Cromatografia de Exclusão Molecular

Parte de ES e de EP foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna com resina Sephadex-G10 com 1,6 cm de diâmetro, 26 cm de altura e volume de resina de 52 mL, em baixa pressão, com bomba peristáltica para o controle do fluxo, correspondendo também a uma etapa de dessalinização. Foram aplicados 30 mL de amostra. Para a cromatografia utilizou-se como tampão de equilíbrio Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, ao fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram coletadas frações de 1,3 mL em microtubos, que foram avaliadas manualmente a A_{214} e A_{280} , visando confirmar a presença de peptídeos.

3.5.5. Cromatografia de Fase Reversa em equipamento tipo HPLC

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram liofilizadas e submetidas à cromatografia fase reversa em HPLC, em coluna C18 (C18-RP-HPLC). A coluna foi equilibrada em TFA 0,1% e as proteínas foram eluídas em gradiente do solvente B (acetonitrila 80% contendo 0,1 % de TFA), ao fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os peptídeos eluídos foram acompanhados pela A_{214} e A_{280} . As proteínas foram separadas em gradiente contínuo de acetonitrila, sendo o gradiente de eluição 0-10 min, 15% de B; 10-70 min, 15 a 60% de B; 70-72 min, 60-100% de B; 72-92 min, 100% de B. Após liofilização, estas frações foram utilizadas para as análises de espectrometria de massa e para o seqüenciamento dos peptídeos.

3.6. SDS –Tricina – PAGE de Três Fases

O enriquecimento dos peptídeos durante a purificação foi avaliado pela presença de massas moleculares na região peptídica (2-14 kDa) em SDS-Tricina-PAGE (Schagger e Von Jagow, 1987; Judd, 1994). Para o gel de separação (16,5 % T), foram utilizadas solução de acrilamida/bis (49,5 % T e 3,0 % C), tampão do gel (Tris-HCl 0,3 M, SDS 0,3 %, pH 8,9), glicerol (10,7 % v/v), persulfato de amônio (0,033 %) e TEMED (0,033 %). O gel intermediário (9,9 % T) foi preparado com os mesmos componentes do gel de separação, excetuando-se o glicerol, que não foi adicionado. Para o gel de concentração (5,1 % T), foram utilizados solução de acrilamida/bis (30,8 % T e 2,6 % C), 12,6 % (v/v) do tampão do gel (Tris-HCl 1M, pH 6,8), EDTA 0,002 M, persulfato de amônio (0,033 %) e TEMED (0,033 %). A eletroforese desenvolveu-se a 100 V por cerca de 15 min, até atingir o gel intermediário, a 80 V por cerca de 20 min, até atingir o gel de concentração, e então a 60 V até o final da corrida, perfazendo cerca de 6,5 h. O tampão do catodo foi Tris-HCl 0,1 M e Tricina 0,1 M, pH 8,31, e o tampão do anodo foi Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9.

O tampão de amostra utilizado consistiu de Tris 100 mM, SDS 4 %, azul de bromofenol 0,025 %, glicerol 12 % (v/v) e β -mercaptoetanol 10 % (v/v). O marcador de massa molecular de ampla faixa (BioRad) era constituído de (em Da) miosina (200.000), β -galactosidase (116.250), fosfolipase b (97.400), soroalbumina bovina (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500). O marcador de massa molecular para peptídeos de baixa faixa consistiu de (em Da): triose fosfatase isomerase (26.600), mioglobina (17.000), α -lactoalbumina (14.200), aprotinina (6.500), cadeia β da insulina (3.496) e bradiquinina (1.060).

3.7. Testes de inibição dos patógenos *in vitro*

3.7.1. Testes de atividade antibacteriana em microplacas

A avaliação da inibição de bactérias fitopatogênicas foi determinada pelo Teste de Leitura de Microplacas, conforme Broekaert *et al.* (1990) e Terras *et al.* (1992), e ajustado por Teixeira *et al.* (2006), utilizando microespectrofotometria (560 nm).

As bactérias fitopatogênicas-teste foram cultivadas em microplacas de 96 poços, de fundo plano, estéreis, em temperatura de 28 °C. A cada poço da microplaca, foram adicionados 50 µL de meio de cultivo concentrado (2X), 10 µL de uma suspensão de bactéria e volumes variáveis (10 a 40 µL) das soluções peptídicas a serem testadas, e quando necessário o volume final de 100 µL foi completado com água Milli Q. As absorvâncias a 560 nm foram determinadas em leitor de microplacas, feitas imediatamente após o preparo da cultura e em períodos de incubação pré-definidos para as bactérias-teste, traçando-se as curvas de crescimento de cada bactéria. A inibição foi determinada pelas curvas de crescimento em presença e em ausência dos peptídeos, cerca de duas horas após atingirem a fase estacionária. Nos ensaios, o controle da cultura correspondeu ao cultivo das bactérias na ausência de peptídeos (90 µL de meio de cultivo 1X e 10 µL de uma suspensão de bactérias), e o controle do meio correspondeu ao cultivo na ausência de bactéria e peptídeos (100 µL de meio de cultivo 1X).

3.7.2. Avaliação da inativação ou morte de juvenis de nematóides

Para cada teste, foram preparadas placas de Petri de 5 cm de diâmetro e, em cada placa, foram colocados 1 mL de suspensão contendo em média 200 juvenis de *Meloidogyne incognita* e extratos peptídicos correspondentes ao *pool* catiônico 1 (PC1) de ES de folhas totalmente expandidas de berinjela (nas quantidades referentes a 1,0 g, 2,0 g e 3,0 g de peso fresco de folhas extraídas) após ultrafiltração. Foram feitas cinco repetições para cada tratamento. As placas foram incubadas a 28 °C. A avaliação foi feita após 24 e 48 horas da montagem do experimento, determinando-se a percentagem de juvenis móveis e imóveis. Cada suspensão, contendo os extratos e os juvenis, foi vertida cuidadosamente sobre a peneira de 0,025 mm de abertura (500 mesh) após a avaliação de 48 h, e os juvenis foram lavados em água corrente. Os juvenis foram então transferidos novamente para as placas de Petri e incubados em água por mais 24 horas. A percentagem de mortalidade foi calculada com base na relação [(número de juvenis imóveis/(número de juvenis imóveis+juvenis móveis)] x 100. A percentagem de recuperação do

movimento dos juvenis foi avaliada para conhecer a atividade nematicida ou nematostática dos extratos.

3.8. Avaliação dos extratos peptídicos *in vivo* sobre as bactérias fitopatogênicas

O isolado de *Ralstonia solanacearum* foi repicado a partir do estoque de glicerol para o meio de Kelmam (0,1% caseína, 0,5% dextrose, 1% peptona, 1,7% Agar, 0,005% tetrazolio) e incubado por 48h. Após a incubação, para a reação de hipersensibilidade (Alfenas *et al.*, 2006) foram selecionadas colônias com centro vermelho e bordas brancas, e estas novamente repicadas para placas contendo meio de Kelman (1954). Após incubação, a bactéria foi raspada com alça de vidro para um recipiente com água e a suspensão resultante foi ajustada ao espectrofotômetro a uma absorvância de 550 nm de 0,1, correspondente a, aproximadamente, 10^8 ufc/ml.

Mudas de tomateiro do cultivar Santa Clara, apresentando de um a dois pares de folhas verdadeiras, tiveram suas raízes lavadas e imersas em extratos peptídicos por quinze minutos, sendo transplantadas após imersão para copos de plástico de 200 mL preenchidos com areia saturada com 90 mL da suspensão bacteriana acima citada. As plantas foram incubadas em câmara de crescimento a 27°C, com fotoperíodo de 12h, e avaliadas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas, sendo avaliada a presença ou ausência de murcha bacteriana. Foram utilizadas 30 plantas para cada tratamento.

Foram feitos controles prévios nos quais água substituiu o material vegetal, que foram submetidos a todas as etapas de extração (itens 3.3. e 3.4) e purificação (itens 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.4). Com os *pools* obtidos dos controles, tanto para ES quanto para EP, foi realizado o teste em que os tomateiros tiveram suas raízes lavadas e imersas nos controles por quinze minutos, sendo transplantadas após imersão para copos de plástico com areia saturada da suspensão bacteriana como descrito acima. O objetivo da realização desses controles foi verificar se compostos presentes nos extratos peptídicos provenientes das etapas de extração e/ou purificação pudessem ser tóxicos para as plantas.

3.9. Seqüenciamento e determinação da massa molecular por técnica espectrométrica do peptídeo purificado

A determinação da massa molecular e o seqüenciamento do peptídeo foram desenvolvidos no Núcleo de Biomoléculas do ICB / UFMG. As análises por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-TOF foram realizadas utilizando-se um aparelho Q-ToF Micro™ (Micromass, Grã-Bretanha), equipado com fonte de ionização *electrospray* operada em modo positivo. A voltagem do capilar foi estabelecida em 3-3.5 kV e as voltagens dos *sample cones* foram 30-40 V. A calibração do espectrômetro de massas é realizada diariamente utilizando-se NaI, com janela de 100 a 2000 *m/z*. As amostras foram diluídas em acetonitrila 50%/TFA 0,1% e introduzidas no aparelho utilizando uma bomba de seringa com fluxos entre 5-10 µL/min (*electrospray*) ou 0,5-1,0 µL/min (*nano-electrospray*). Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa MassLynx® 4.0.

A determinação da seqüência de aminoácidos foi realizada no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob coordenação do Prof Marcelo Porto Bemquerer. Para o seqüenciamento, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Edman (1950), automatizado. Amostras de proteínas nativas ou alquiladas (50 - 200 pmol) foram seqüenciadas utilizando um seqüenciador automático de proteínas, Shimadzu PPSQ-21A.

Cerca de 50 µL de amostra, em solução de 0,1:0,5:0,5 TFA:H₂O:ACN, foi aplicada sobre um disco de fibra de vidro contendo o polímero SEQUA-BRENE (Sigma), previamente tratado de acordo com procedimentos padronizados do equipamento PSSQ-21A. A derivatização foi feita com solução de fenilisotiocianato em n-heptano à 5 % na presença de solução de ácido trifluoroacético e trimetilamina a 12%. A derivatização é seguida por uma etapa de conversão do intermediário tiazolina em PTH-aminoácido por uma solução aquosa de ácido trifluoroacético a 25%. A separação dos PTH-aminoácidos foi feita em uma coluna de fase reversa (WAKOSIL-PTH 25 cm x 4,6 mm , Wako, Japão) com a eluição conduzida em condição isocrática por uma solução de composição desconhecida (Wako, Japão). A identificação dos PTH-aminoácidos foi feita pelos tempos de retenção, comparando-se com um padrão.

3.10. Identificação de seqüências homólogas de defensinas em banco de dados

Pesquisa de análises de seqüência, usando Gen Bank como banco de dados e programas como BLAST e CLUSTAL W, foram realizadas com o objetivo de obter seqüências de peptídeos de berinjela que sejam similares às de peptídeos antimicrobianos já identificados de outras espécies.

3.10.1- A identificação de seqüências homólogas em berinjela foi feita utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),

Capítulo I

Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de plantas de berinjela em três estádios de desenvolvimento

Os resultados iniciais da bioprospecção de peptídeos antimicrobianos deram origem ao trabalho intitulado: “Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*” da autoria de Hebréia Oliveira Almeida, Felipe Roberti Teixeira, Reginaldo da Silva Romeiro, Derly José Henriques da Silva, Paulo Roberto Gomes Pereira, Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Maria Cristina Baracat-Pereira, submetido na revista *Summa Phytopathologica*, aguardando publicação (Cópia no anexo 1). Os resultados desse capítulo deram origem ao trabalho intitulado: “Peptide-Fraction Inhibiting Plant-Pathogen Growth Predominated in Cell-Wall Extracts from Young Plants or in Soluble-Cell Fraction from Expanded-Leaves from Eggplants” da autoria de Hebréia Oliveira Almeida, Eliciane C. Mattos, Meire Oliveira Barbosa, Felipe Roberti Teixeira, Reginaldo da Silva Romeiro, Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Maria Cristina Baracat-Pereira, submetido a revista *Journal of Phytopathology*, aguardando parecer (Cópia no anexo 2).

I.1. Introdução

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa sofisticados contra patógenos diversos, como fungos, bactérias e vírus, incluindo barreiras antimicrobianas constitutivamente expressas, assim como mecanismos de defesa induzidos pela presença do patógeno (Thuerig *et al.*, 2006). Em tecidos vegetativos, uma série de mecanismos de defesa podem ser ativados após um ferimento ou após a percepção de um fitopatógeno (Terras *et al.*, 1995).

As plantas podem desenvolver resistência a doenças de acordo com sua idade - um fenômeno conhecido como resistência relacionada à idade (Panter e Jones, 2002). A dependência do desenvolvimento da doença na planta em seus diferentes estádios de desenvolvimento é bem relatada em diferentes sistemas

planta-patógeno (Chase *et al.*, 1986; Pretorius *et al.*, 1988; Rupe e Gbur, 1995; Zeier, 2005). A rede de mecanismos de defesa de plantas que confere resistência a doenças não é estática, mas governada por fatores externos, pelo estado fisiológico e pelo estágio de desenvolvimento da planta (Graham e Graham, 1996; Zeier *et al.*, 2004). Uma comparação completa do procedimento de defesa da planta em situações fisiológicas diferentes é necessária para caracterizar em quais condições as plantas são bem ou pobremente equipadas para se defender (Zeier, 2005).

Diversas estratégias de defesa desenvolvidas pelas plantas já foram elucidadas. Um exemplo é um aumento na síntese de carboidratos, e esses são depositados na parede celular em resposta à penetração das hifas de fungos (Aist, 1976), uma resposta que fortalece a parede celular, impedindo a entrada do patógeno (Terras *et al.*, 1995). Além disso, elicitores, depois de ligados a receptores específicos da planta, ativam uma cascata de sinalização, resultando em mecanismos de defesa bioquímicos como a produção de fitoalexinas (Mansfield, 2000) e proteínas com atividades antimicrobianas (Linthorst, 1991).

Plantas de berinjela de algumas variedades não são hospedeiras de fitopatógenos de tomateiros, possivelmente por expressarem compostos naturais de defesa, dentre outros fatores. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo primordial extrair e purificar parcialmente formas de AMPs presentes em plantas jovens, com 5 e 15 cm de altura, e em folhas totalmente expandidas de berinjela, e avaliar a ação antimicrobiana desses extratos peptídicos *in vitro* contra as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, visando avaliar ainda a atividade antimicrobiana peptídica em plantas em diferentes estádios de desenvolvimento.

I.2. Resultados e Discussão

Visando auxiliar no acompanhamento das etapas do trabalho, foi feito um fluxograma com a metodologia de purificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela empregada nessa etapa do trabalho (Figura 1).

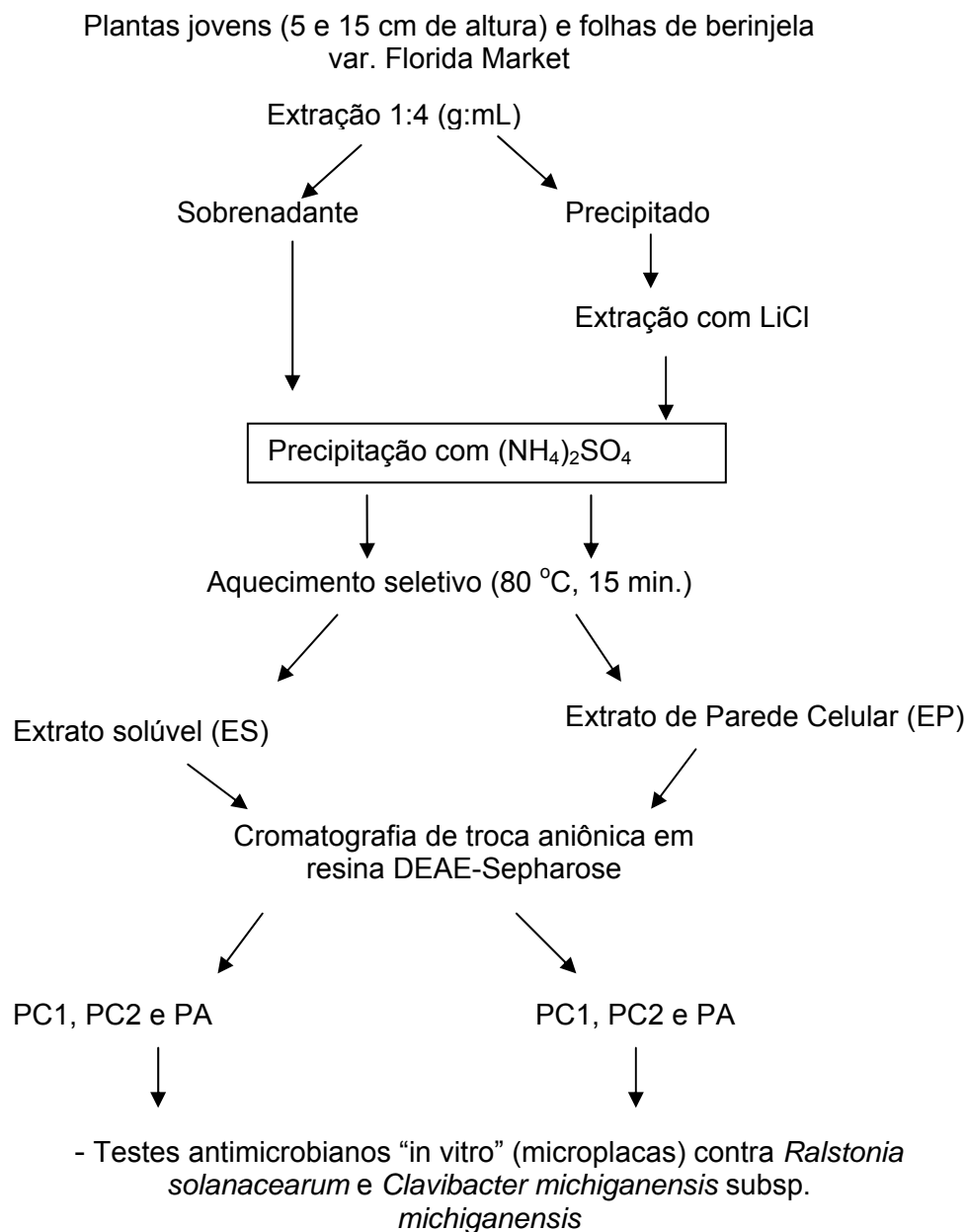


Figura 2 - Fluxograma com a metodologia de purificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela .

Plantas jovens de berinjela com 5 e 15 cm de altura e folhas totalmente expandidas foram avaliadas como material fonte para a prospecção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) considerando-se a característica ubíqua dos peptídeos de defesa nos organismos, nos tecidos e as diferentes localizações celulares nas plantas (Broekaert *et al.*, 1997; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001; Zasloff, 2002).

Os protocolos de preparo de extratos protéicos e de enriquecimento peptídico foram desenvolvidos com sucesso, tendo sido definidas as etapas a seguir: Foram preparados extratos solúveis brutos (ESB) e de parede celular bruto (EPB) das plantas jovens em dois estádios de desenvolvimento (5 e 15 cm de altura) e de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, que foram submetidos a etapas de purificação por precipitação com sulfato de amônio e aquecimento seletivo. Após diálise, liofilização e ressuspensão em água Milli-Q, foram obtidos os denominados extratos solúveis (ES) e extratos de parede celular (EP), que foram separadamente submetidos à cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose (Figura 3). Foram recuperados, para cada extrato, dois picos catiônicos, denominados PC1 e PC2, e um pico aniônico, designado PA, que tiveram suas atividades antimicrobianas avaliadas contra as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum*, Gram-negativa, e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Gram-positiva, nos três estádios de desenvolvimento em estudo. Todos os testes foram desenvolvidos em duplicata e os testes com os extratos das folhas totalmente expandidas da berinjela foram feitos em duas concentrações do extrato protéico, sendo uma o dobro da outra para verificar o efeito da concentração de compostos sobre a inibição do crescimento das bactérias.

Diferentes formas peptídicas podem ser expressas em localizações celulares e em etapas de crescimento diferenciados, o que justifica a prospecção de AMPs em dois tipos de extrato, EP e ES, e em três diferentes estádios de desenvolvimento. Extratos de parede celular, especialmente, podem conter peptídeos antimicrobianos de interesse. As camadas celulares periféricas de órgãos ou tecidos vegetais diversos, como sementes, flores, vagens, caules, raízes e folhas primordiais, podem alocar peptídeos de defesa, constitutivos e com expressão órgão-específica (Broekaert *et al.*, 1997). Essa expressão pode ser modulada por patógenos que alteram o nível e, ou, a tecido-especificidade, especialmente em folhas (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001). As características das coberturas celulares vegetais podem estar fortemente associadas à capacidade de evitar a infecção de fitopatógenos, como em tomate, quando a limitação no movimento de *Ralstonia solanacearum* nos tecidos primários do xilema pareceu ser resultante do

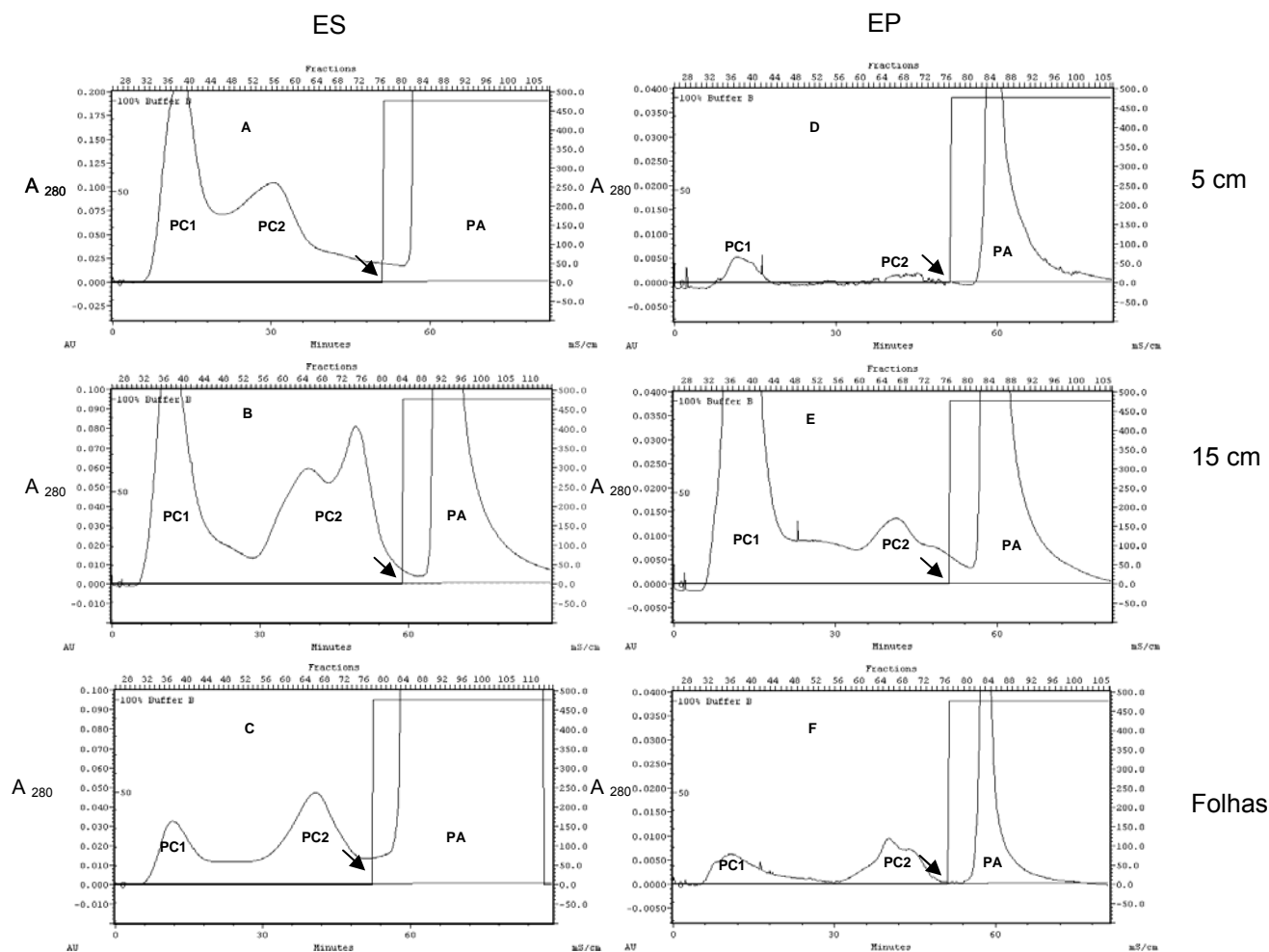


Figura 3- Perfis cromatográficos de troca aniônica em DEAE-Sepharose de ES (A, B e C) e de EP (D, E e F) de plantas de berinjela da variedade “Florida Market” com 5 cm (A e D) e 15 cm (B e E) de altura e de folhas totalmente expandidas (C e F). As frações obtidas foram designadas *pools* catiônicos 1 (PC1), 2 (PC2) e *pool* aniônico (PA). As setas indicam o início da eluição em presença de NaCl 1 M. As frações foram monitoradas a 280 nm.

fortalecimento da parede celular (Nakano, 2000).

Biomoléculas não protéicas e algumas proteínas foram removidas pela precipitação com sulfato de amônio a 35 % de saturação, enquanto que o aquecimento a 80 °C por 15 minutos auxiliou na eliminação de proteínas de alta massa molecular, favorecendo o enriquecimento dos extratos em peptídeos.

As bactérias utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana foram escolhidas por representarem os dois grupos bacterianos com composições diferentes das coberturas celulares, e como patógenos de culturas comerciais importantes, como as solanáceas, dentre elas o tomateiro. As percentagens de

inibição do crescimento das duas bactérias, relativas ao controle da cultura (ausência dos peptídeos, zero % de inibição) foram calculadas para o tempo de 14 horas de cultivo, para plantas jovens com 5 e 15 cm de altura e folhas totalmente expandidas (Tabela 1), pois esse tempo representou, aproximadamente, o início (duas a quatro horas) da estabilização do crescimento das culturas para todas as amostras analisadas.

As frações PC1, PC2 e PA obtidas de EP de plantas com 5 cm de altura apresentaram maior capacidade de inibição do crescimento das bactérias quando comparadas com plantas com 15 cm enquanto que frações de ES obtidas de plantas maiores (15 cm de altura) apresentaram maior capacidade de inibição quando comparadas com plantas de 5 cm (Tabela 1). ES de plantas com 5 cm de altura apresentaram baixo poder inibitório, podendo promover o aumento do crescimento bacteriano, quando comparadas com o controle. Esses resultados sugerem que plantas mais jovens possivelmente expressam compostos inatos de defesa, como AMPs de parede celular, para evitar a infecção por patógenos, usando a defesa externa às células. Essa observação está de acordo com Nakano *et al.* (2000), que relatam que a parede celular corresponde à localização adequada para a expressão de peptídeos que atuam como moléculas de defesa primária inata. Plantas com 15 cm podem estar expressando especialmente agentes intracelulares de defesa, incluindo-se os AMPs. À semelhança para extratos de folhas totalmente expandidas, observou-se que as frações provenientes de ES apresentam maior capacidade inibidora do que EP, especialmente avaliando-se as amostras com menor concentração quando comparou-se o peso fresco de material vegetal.

Análise por SDS-Tricina-PAGE (Judd, 1994) de três fases revelado por Coomassie Brilliant Blue (Almeida *et al.*, 2006, ver em anexo 1) de frações de ES e EP parcialmente purificados obtidas de folhas totalmente expandidas de berinjela, evidenciaram a presença de peptídeos especialmente em PC2. Esse resultado está de acordo com as altas atividades antimicrobianas observadas para PC2 (Tabela 1).

A capacidade de inibição bacteriana sugere ser dependente da concentração dos extratos de folhas totalmente expandidas avaliadas para ES e EP (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividades antimicrobianas relativas ao controle da cultura (100% de crescimento) dos *pools* catiônicos (PC1 e PC2) e aniônico (PA) de extratos solúveis (ES) e de parede celular (EP) de plantas jovens com 5 e 15 cm de altura, e de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”

Percentagem de Inibição do Crescimento Bacteriano para 14 Horas de Cultivo				
(média ± DP)				
<i>Ralstonia solanacearum</i>				
Amostras	Plantas com 5 cm (1,25g)*	Plantas com 15 cm (1,25g)*	Folhas totalmente expandidas	
			0.75g*	1.5g*
ES PC1	-43,3 ± 0,082**	92,2 ± 0,003	90,8 ± 0,004	85,2 ± 0,000
ES PC2	0,75 ± 0,012	86,2 ± 0,001	100 ± 0,003	100 ± 0,001
ES PA	23,9 ± 0,005	14,2 ± 0,001	92,0 ± 0,000	100 ± 0,005
EP PC1	8,60 ± 0,000	3,70 ± 0,014	1,80 ± 0,001	45,8 ± 0,029
EP PC2	91,0 ± 0,000	80,0 ± 0,004	29,6 ± 0,019	88,0 ± 0,006
EP PA	14,2 ± 0,005	0,75 ± 0,007	69,0 ± 0,006	73,4 ± 0,018
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>				
Amostras	Plantas com 5 cm (1,25g)*	Plantas com 15 cm (1,25g)*	Folhas totalmente expandidas	
			0.75g*	1.5g*
ES PC1	-47,7 ± 0,019**	53,5 ± 0,028	74,2 ± 0,008	60,4 ± 0,003
ES PC2	-10,0 ± 0,010**	53,3 ± 0,013	80,4 ± 0,001	96,3 ± 0,003
ES PA	-20,3 ± 0,006**	-1,50 ± 0,018**	78,2 ± 0,001	80,4 ± 0,011
EP PC1	19,8 ± 0,007	0,00 ± 0,019	25,2 ± 0,013	29,7 ± 0,017
EP PC2	58,4 ± 0,021	50,0 ± 0,004	54,9 ± 0,006	100 ± 0,010
EP PA	18,8 ± 0,019	5,10 ± 0,021	54,9 ± 0,005	47,8 ± 0,008

* Para os ensaios com extratos de plantas jovens foram utilizados extratos obtidos de 1,25 g de material vegetal e para folhas totalmente expandidas extratos obtidos de 0,75 g e 1,5 g de material vegetal.

** O sinal negativo indica maior crescimento da cultura bacteriana quando comparada com o controle da cultura.

Diferentes moléculas presentes nesses extratos parcialmente purificados podem estar promovendo efeitos ativadores e/ou inibidores do crescimento simultaneamente. Proteínas ou outras moléculas orgânicas poderiam estar sendo utilizadas como fontes de carbono, além da presença de outros compostos que favorecem o crescimento das bactérias.

A bactéria *R. solanacearum* mostrou-se mais susceptível aos efeitos inibitórios das frações avaliadas do que a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. A alta atividade inibitória observada para a *R. solanacearum*, especialmente por ES, é de grande interesse pois apenas quatro das dez classes descritas de AMPs de plantas inibem bactérias Gram-negativas (Garcia-Olmedo *et al.*, 2001). Esses peptídeos são incapazes de criar um sistema de auto-transporte via membranas das bactérias, e devem apresentar mecanismos alternativos, como interações com receptores de membranas, que deverão conferir especificidade à ação do peptídeo (Tejada *et al.*, 1995).

Embora a literatura relate que folhas maduras sadias não sejam, em geral, boas fontes de peptídeos antimicrobianos constitutivos (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001, Zasloff, 2002), esse trabalho demonstrou que folhas totalmente expandidas de berinjela possuem peptídeos de defesa, com alta atividade inibitória para as duas bactérias testadas (Almeida *et al.*, 2006, ver em anexo 1). Algumas variedades de solanáceas, como berinjela, pimentão e pimenta, são naturalmente tolerantes a alguns fitopatógenos relevantes, e a expressão dos peptídeos antimicrobianos poderia representar uma defesa pré-existente e constitutiva, e ainda participar de uma resposta induzida por infecção (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001, Morassutti *et al.*, 2002).

Os fitopatógenos testados atacam importantes culturas comerciais. O uso de AMPs como princípios ativos de defensivos agrícolas pode representar uma forma promissora de controle desses patógenos e de outros de importância comercial. Sabe-se, ainda, que muitos AMPs podem atuar de forma sinérgica ou aditiva (Giacometti *et al.*, 2005) e peptídeos diferentes presentes nas frações enriquecidas poderiam atuar em conjunto com melhor capacidade inibitória para o controle de algumas doenças vegetais.

I.3. Conclusões

O protocolo de extração de peptídeos antimicrobianos de plântulas e de folhas expandidas de berinjela foi ajustado com sucesso. Os resultados obtidos indicam a presença de atividade antimicrobiana nas frações enriquecidas e sugerem que peptídeos ou frações peptídicas de folhas de berinjela apresentam potencial para aplicação como agentes de defesa de plantas. Algumas frações inibiram totalmente as culturas das bactérias *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, resultado relevante frente ao objetivo de encontrar peptídeos antimicrobianos de amplo espectro de ação, que atuem como moléculas-modelo para o desenvolvimento de produtos naturais para o controle de doenças vegetais.

A alta atividade inibitória observada para a *R. solanacearum*, especialmente por ES, é importante pois apenas quatro das dez classes descritas de peptídeos antimicrobianos de plantas inibem bactérias Gram-negativas (Garcia-Olmedo *et al.*, 2001).

Plantas jovens parecem apresentar alta defesa inata na forma de peptídeos expressos nas paredes celulares, enquanto que plantas em estádios mais avançados de desenvolvimento já podem estar desenvolvendo um sistema induzido de defesa, com a expressão intracelular de agentes de defesa, incluindo-se os peptídeos.

AMPs vêm sendo descritos como possíveis agentes de defesa contra fitopatógenos, pois em geral apresentam baixa indução de resistência (Heinemann, *et al.*, 2000), baixa toxicidade para animais e poucos danos ambientais (Knight *et al.*, 1997; Gerhardson, 2002; Zasloff, 2002). A caracterização de peptídeos com poder inibitório do crescimento de patógenos pode ser uma nova ferramenta no desenvolvimento biotecnológico, por meio da produção de plantas superexpressando essas moléculas de defesa ou por síntese química das mesmas.

Bioprospecção de peptídeos antimicrobianos em folhas totalmente expandidas de berinjela

II.1. Introdução

Os AMPs apresentam potencial considerável para uma variedade de aplicações terapêuticas para diferentes organismos (Aumelas *et al.*, 1996). Uma das principais vantagens na utilização destes AMPs é que estes compostos, em geral, parece não promoverem indução de resistência microbiana, o que ocorre com vários medicamentos existentes. Apesar de não se conhecer claramente os mecanismos de ação, os peptídeos têm mostrado expressiva atividade *in vitro* contra microrganismos resistentes a antibióticos convencionais. A resistência aos agrotóxicos, desenvolvida pelos microrganismos fitopatogênicos de importância agrônômica, é considerado um fator limitante na eficácia e na vida útil das mais variadas estratégias de controle de doenças vegetais.

Nos últimos anos, estima-se que perdas de alimento e de lucros dos produtos pela ação de fitopatógeno sejam de aproximadamente 20% do total mundial, mesmo com o uso dos fungicidas comerciais disponíveis (Rommens e Kishore, 2000). Diante destes dados, o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia agrícola. A busca por peptídeos antimicrobianos estimula a prospecção de novas classes de moléculas naturais e/ou sintéticas, capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo, inibindo assim o desenvolvimento da resistência (Heinemann *et al.*, 2000). O amplo espectro de ação e a não-toxicidade para células de mamíferos de alguns peptídeos vegetais (Terras *et al.*, 1992; 1993; 1995; Moreno *et al.*, 1994; Osborn *et al.*, 1995) deixam os cientistas otimistas, pois sinalizam para o desenvolvimento de bactérias ou plantas geneticamente modificadas que poderão ser utilizadas como biorreatores para a produção de agentes antimicrobianos ou antibióticos em grande escala, visando o uso como defensivos agrícolas naturais ou agentes terapêuticos para animais.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi a bioprospecção de peptídeos com atividade antimicrobiana a partir de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, visando identificar princípios ativos para a produção futura de defensivos naturais contra fitopatógenos ou a transferência dos genes que codificam esses peptídeos para os tomateiros, produzindo plantas de tomate resistentes e menos sujeitas à pulverização com agentes de defesa químicos, tóxicos aos animais e à natureza.

II.2. Resultados e Discussão

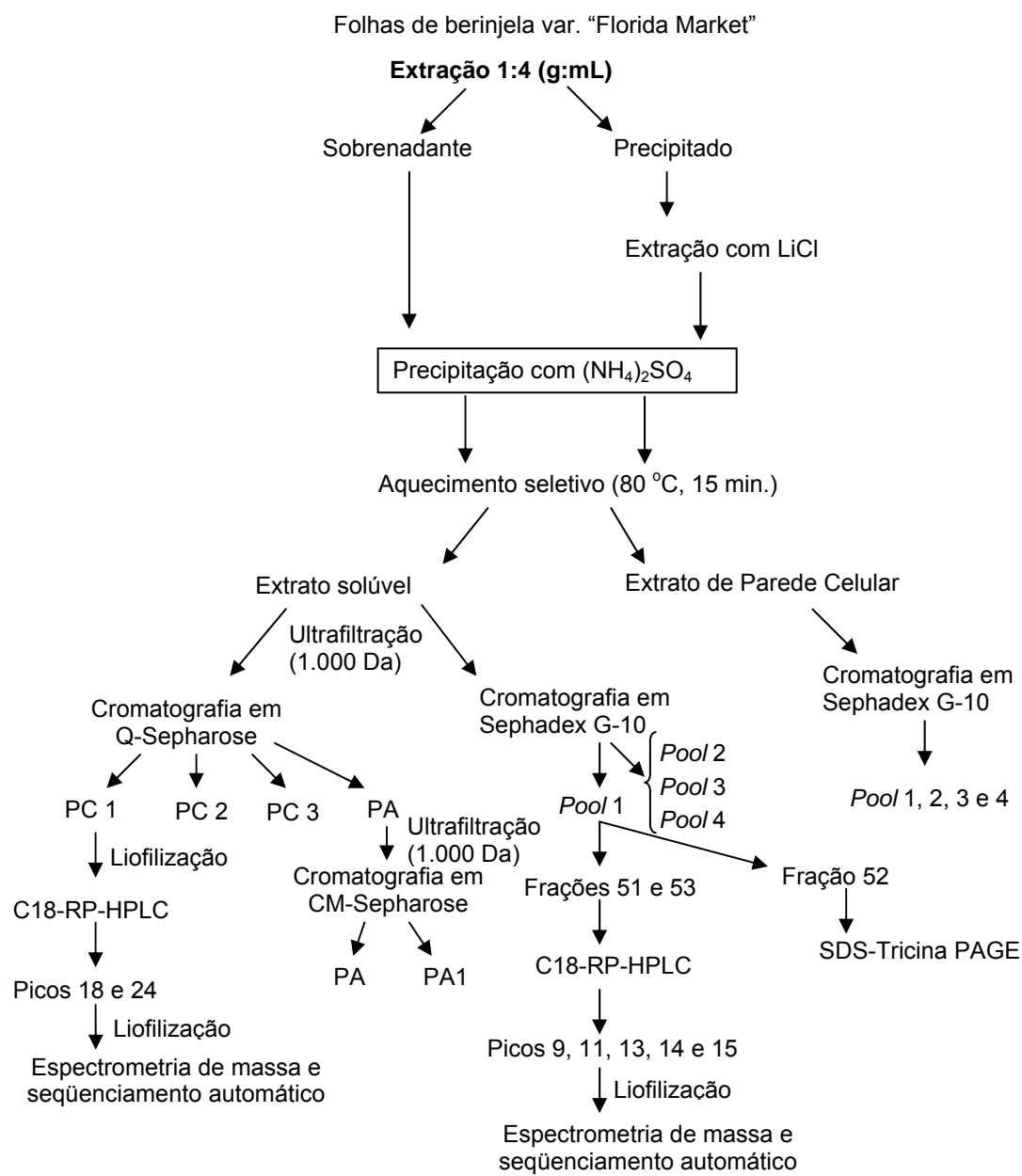
Considerando o uso de diferentes protocolos de purificação, que deram origem a frações e *pools* variados, o Protocolo Geral de Purificação do Peptídeos Antimicrobianos de Folhas de Berinjela, está apresentado (Figura 4), visando auxiliar no acompanhamento das etapas do trabalho.

II.2.1. Purificação de ES em resina Q-Sepharose seguida por fase reversa C18-HPLC

Novos extratos peptídicos foram preparados a partir de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, conforme itens 3.3 e 3.4. A proposta de purificação dos peptídeos presentes nos extratos foi desenvolvida com sucesso e consistiu do fracionamento com sulfato de amônio e aquecimento seletivo, conforme itens 3.5.1 e 3.5.2. Considerando que o extrato solúvel (ES) de folhas maduras de berinjela apresentou atividade antimicrobiana e, assim, mostrou-se muito promissor para a bioprospecção de peptídeos antimicrobianos, ES foi utilizado como material-fonte para purificar AMPs. EP foi reservado para trabalhos posteriores.

Após a etapa de aquecimento, o ES foi ultrafiltrado e concentrado em membranas de limite de exclusão de 1.000 Da, em equipamento de filtração positiva do tipo AMICON/MILLIPORE. O material dessalinizado foi submetido à cromatografia aniônica em coluna Q-Sepharose (Figura 5A), conforme item 3.5.3. Foram recuperados três *pools* catiônicos, denominados PC1, PC2 e PC3, e um *pool* aniônico, denominado PA.

A



B

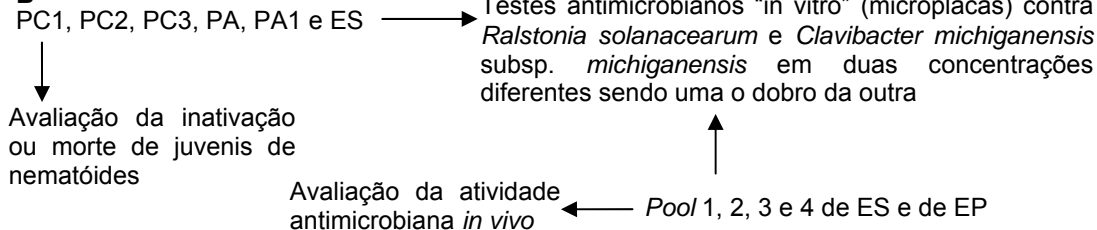


Figura 4 - A) Protocolo geral de purificação do peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela. B) Ensaio biológico com os diversos pools obtidos em A.

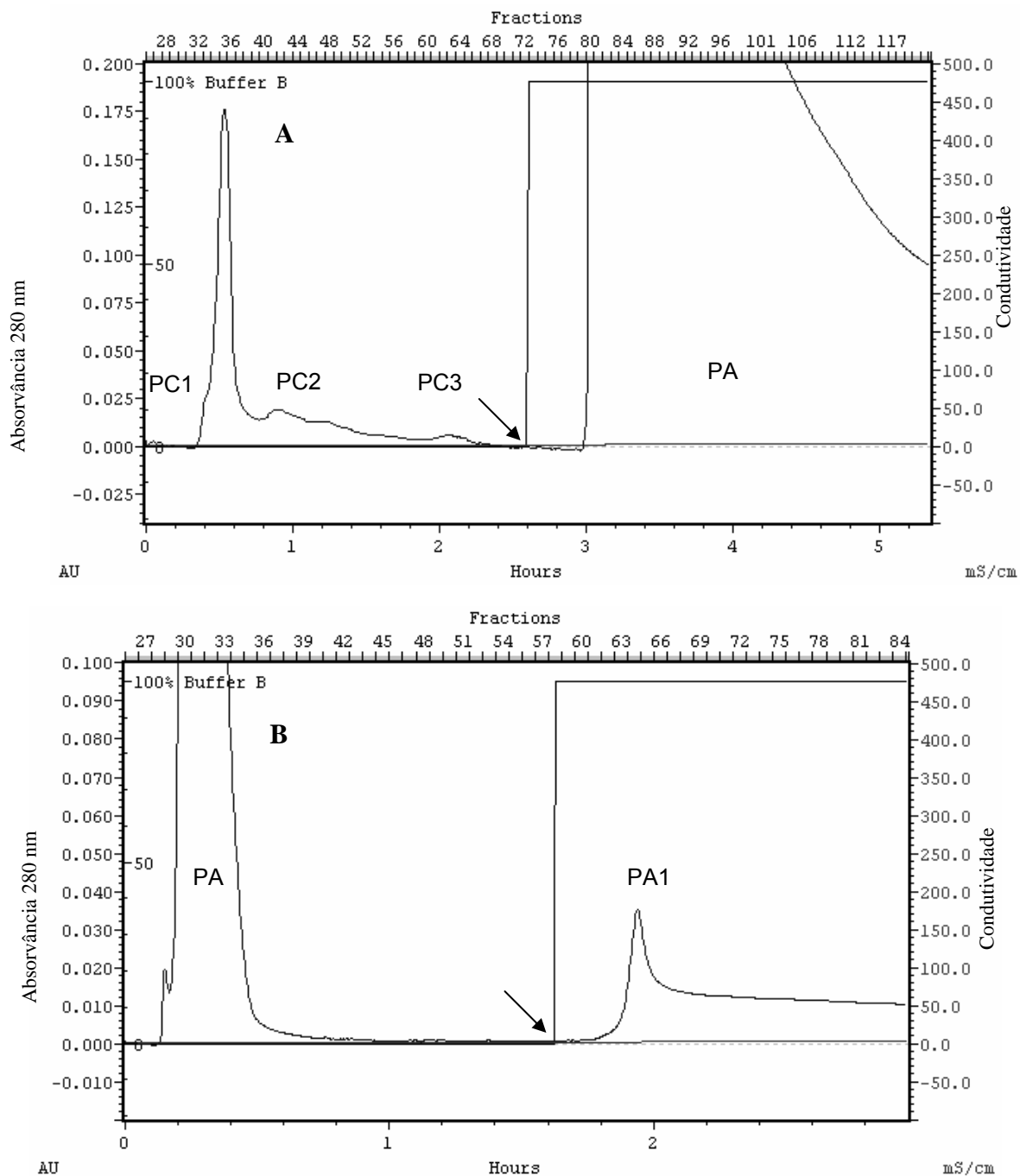


Figura 5- (A) Perfil cromatográfico de troca aniônica em Q-Sepharose de ES de folhas totalmente expandidas de berinjela. A coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0. As frações recuperadas foram designadas *pools* catiônicos 1 (PC1), 2 (PC2) e 3 (PC3) e *pool* aniônico (PA). O PA foi separado por CM-Sepharose (B). A coluna foi equilibrada com tampão MES 25 mM, pH 6,0. Foram recuperados um *pool* aniônico (PA) e um outro *pool* aniônico (PA1). As proteínas foram eluídas com o tampão de equilíbrio na presença de NaCl 1 M (setas). Foram coletadas frações de 1 mL ao fluxo de 1 mL.min⁻¹.

Os *pools* PA de diversas corridas foram reunidos e separados em coluna de troca catiônica CM-Sepharose, conforme item 3.5.3, visando separar compostos protéicos aniônicos dos compostos fenólicos (Figura 5B), considerando a presença de grande quantidade de compostos fenólicos na fração aniônica eluída da coluna e o nosso interesse em peptídeos aniônicos.

Para isso, o material foi previamente dessalinizado por ultrafiltração em membrana de 1.000 Da e então separado nessa coluna. Foram recuperados um *pool* aniônico (PA) e uma fração denominada *pool* aniônico 1 (PA1), contendo as proteínas com pI entre 6,0 e 7,0, eluídas na presença de 1 M de NaCl. PA apresentou coloração escura, característica da presença de compostos fenólicos, indicando não ter ocorrido a separação desejada. Assim, apenas a busca por peptídeos catiônicos foi realizada nesse trabalho.

Todos os *pools* obtidos, PC1, PC2, PC3, PA e PA1, e também o extrato solúvel (ES, item 3.5.2) foram separadamente dessalinizados, concentrados e então utilizados para desenvolver testes de atividade antimicrobiana em microplacas contra as bactérias *R. solanacearum* (Figura 6A) e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 6B). Todos os *pools* foram testados em duas concentrações, correspondentes a 0,75 g e 1,5 g de peso fresco de folhas utilizadas na extração.

Com o objetivo de avaliar o potencial inibitório das diferentes frações, as percentagens de inibição do crescimento das duas bactérias, relativas ao controle da cultura (ausência dos peptídeos, com zero % de inibição) foram comparadas entre as frações analisadas para o tempo de 16 horas de cultivo (Figura 7). Esse tempo de cultivo representou, aproximadamente, o início da estabilização do crescimento das culturas para todas as amostras analisadas. Resultados de percentagem de inibição negativos (Figura 7) indicam maior crescimento dessas culturas quando comparadas com o controle. Considerando que a leitura dos ensaios é feita em leitor em que há necessidade de a placa ser rapidamente aberta, longos tempos de ensaio foram evitados a fim de não comprometer os resultados por contaminação das culturas.

As percentagens de inibição demonstraram diferentes capacidades inibitórias das frações enriquecidas em peptídeos. Para a bactéria *R. solanacearum* (Figura

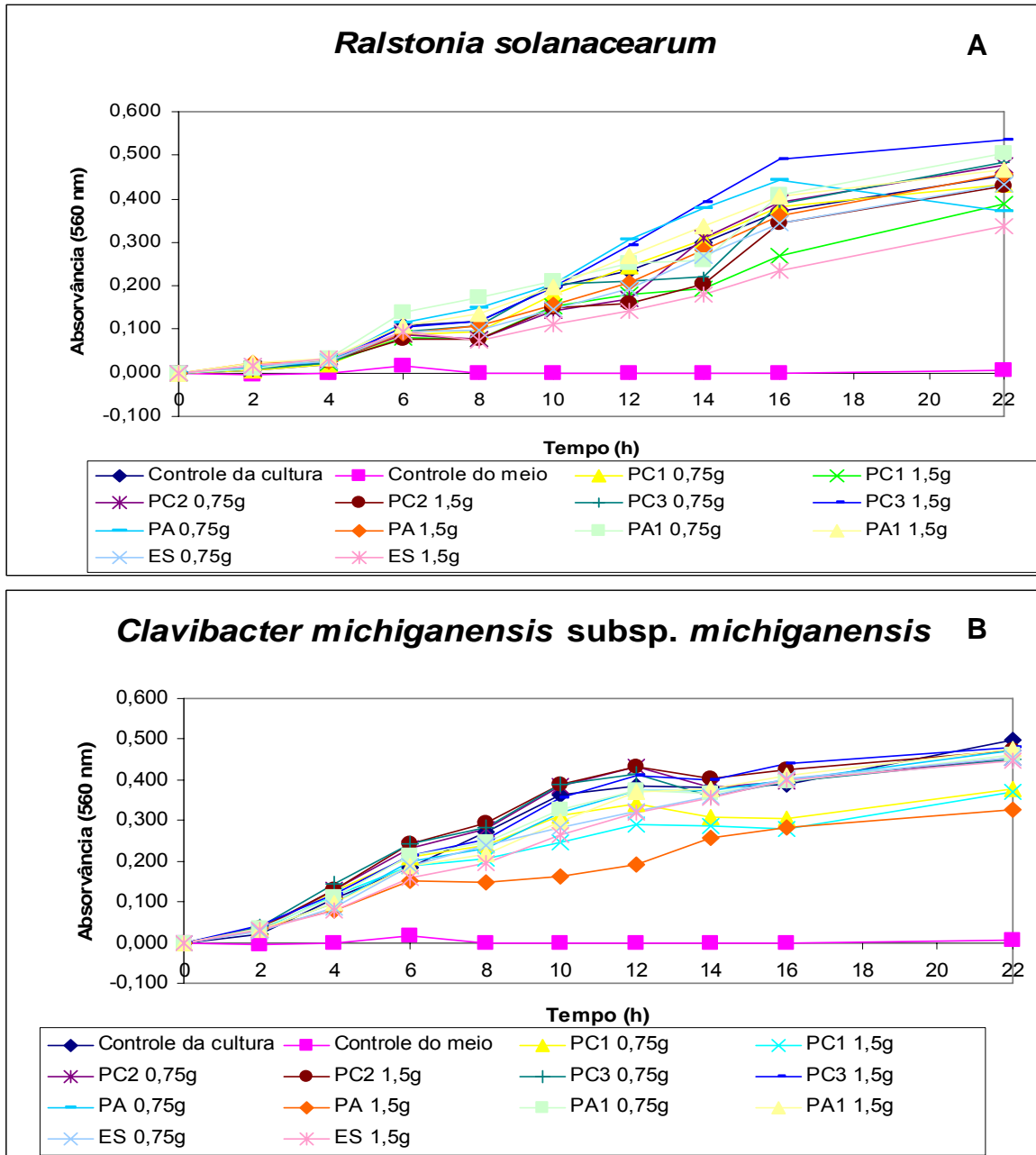


Figura 6- Atividade antimicrobiana dos *pools* catiônicos (PC1, PC2 e PC3), aniônico (PA) e aniônico 1 (PA1) obtidos do extrato solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market” contra as bactérias *Ralstonia solanacearum* (A) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B), avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas. O controle da cultura correspondeu ao cultivo da bactéria em ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria e dos extratos. Os *pools* foram avaliados em duas concentrações, sendo uma o dobro da outra.

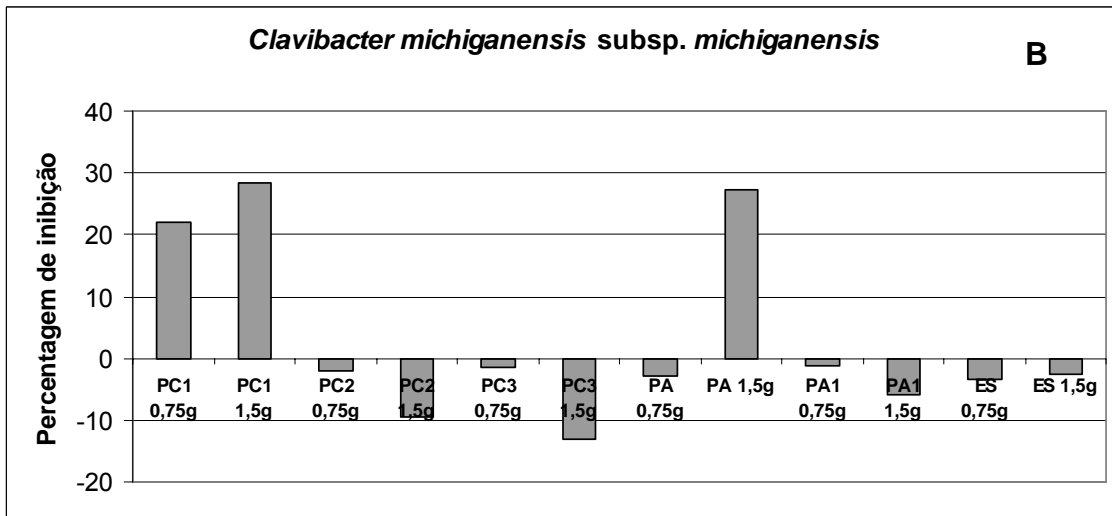
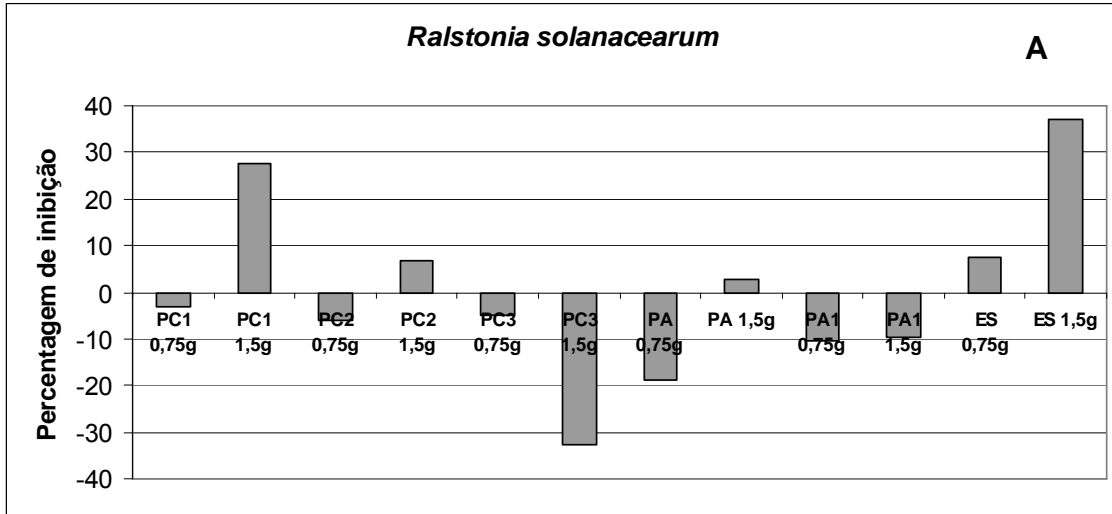


Figura 7- Percentagem de inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* (A) e de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B) pelos *pools* catiônicos (PC1, PC2 e PC3), aniônico (PA) e aniônico 1 (PA1) obtidos do extrato solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”. As percentagens de inibição dos *pools* sobre o crescimento foram avaliadas em relação ao controle da cultura (cultivo na ausência de frações peptídicas, zero % de inibição, dados não apresentados). O controle do meio de cultura correspondeu ao meio não inoculado (100 % de inibição, dados não apresentados).

7A), observa-se uma inibição do crescimento ocasionada pelos PC1, PC2 e PA nas concentrações mais altas avaliadas. Para as menores concentrações avaliadas de PC1, PC2 e PA, e para PC3 e PA1, observou-se ativação no crescimento. Além

disso, é possível notar que ES possui uma alta atividade antibacteriana para essa bactéria (37 % de inibição do crescimento), mas compostos ativadores e inibidores do crescimento devem estar ali presentes. Para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 7B) observou-se que, na presença do ES, houve um crescimento superior àquele obtido na ausência do extrato. Entretanto, na presença apenas da fração PC1, houve inibição do crescimento de cerca de 23 % e 28 % nas concentrações equivalentes a 0,75 g e 1,5 g de folhas extraídas, respectivamente. Resultado semelhante foi observado para o *pool* PA na maior concentração. Esse resultado sugere que PC1 e PA podem estar enriquecidos em compostos antimicrobianos, que estão também presentes em ES. Outros compostos ativadores do crescimento, presentes em ES, alteram o resultado não permitindo a percepção de compostos inibidores possivelmente presentes em ES. PC1 se mostrou o *pool* mais efetivo no controle do crescimento de ambas as bactérias, tal atividade pode ser em função de um maior enriquecimento pelos compostos peptídicos antimicrobianos.

Com esses resultados, PC1 pode ser considerada a fração peptídica de maior interesse, já que mostrou-se enriquecida em compostos antibacterianos para as duas bactérias-teste avaliadas. As inibições se mostraram dependentes da concentração dos compostos inibidores presentes nas frações. Extratos que mostraram atividade antimicrobiana foram mais efetivos em concentrações mais elevadas.

Visando avaliar a presença de peptídeos na fração com atividade antimicrobiana, PC1 foi então analisado por SDS-Tricina-PAGE de três fases, revelado por Coomassie Brilliant Blue (Figura 8).

Ao lado de proteínas de massa molecular elevada, observou-se a presença de peptídeos com massa molecular abaixo de 6.500 Da, que podem corresponder a peptídeos antimicrobianos. Salienta-se que esse trabalho foi desenvolvido com material vegetal não submetido a condição de estresse e, assim, as formas peptídicas porventura presentes são constitutivas, e são em geral expressas em baixa concentração nos organismos. Dessa forma, considerando que os peptídeos antimicrobianos estão presentes em muito baixas concentrações nos tecidos vegetais (Broekaert *et al.*, 1997; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001), a metodologia de

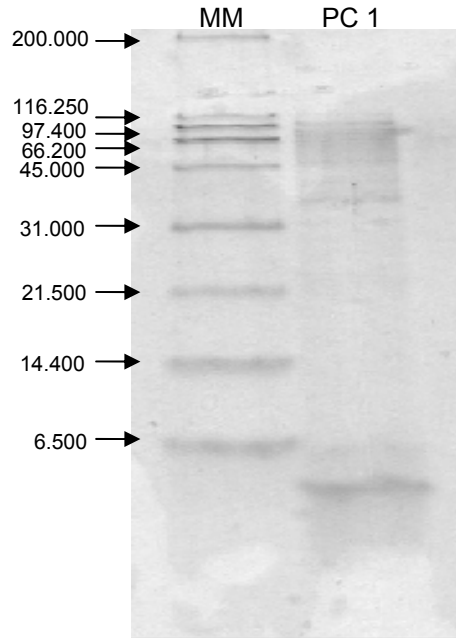


Figura 8 - SDS-Tricina-PAGE de três fases do pico catiônico 1 (PC1) de extrato solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, após troca aniônica em Q-Sepharose. O gel foi revelado por Coomassie Brilliant Blue. As amostras foram: **MM**: padrão de massa molecular de ampla faixa, 5 μ L; *Pool* catiônicos 1 (PC1) obtidos de ES.

enriquecimento dessas moléculas foi satisfatória para as folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade em estudo, possibilitando visualizar peptídeos no gel revelado com Coomassie Brilliant Blue (Figura 8), que é uma coloração de baixa sensibilidade (Patton, 2002).

Assim, o PC1 de ES, enriquecido com peptídeos básicos, obtido da cromatografia de troca aniônica, foi liofilizado e utilizado como amostra para as cromatografias de fase reversa em HPLC utilizando-se a coluna C_{18} (C18-RP-HPLC), que tem o objetivo identificar diferentes frações peptídicas presentes no PC1 (Figura 9). Foram coletados picos protéicos/peptídicos. Alguns picos mais promissores, indicados por setas na Figura 9, eluídos nessa região, foram liofilizados e ressuspensos em 50 μ L de TFA 0,1% e aplicados, via *loop*, em um espectrômetro de massa tipo *Electron-spray*, (conforme item 3.9), tendo sido possível identificar as massas moleculares de 3.703,43 para o pico 18 e 4.139,23 para o pico 24, que estão

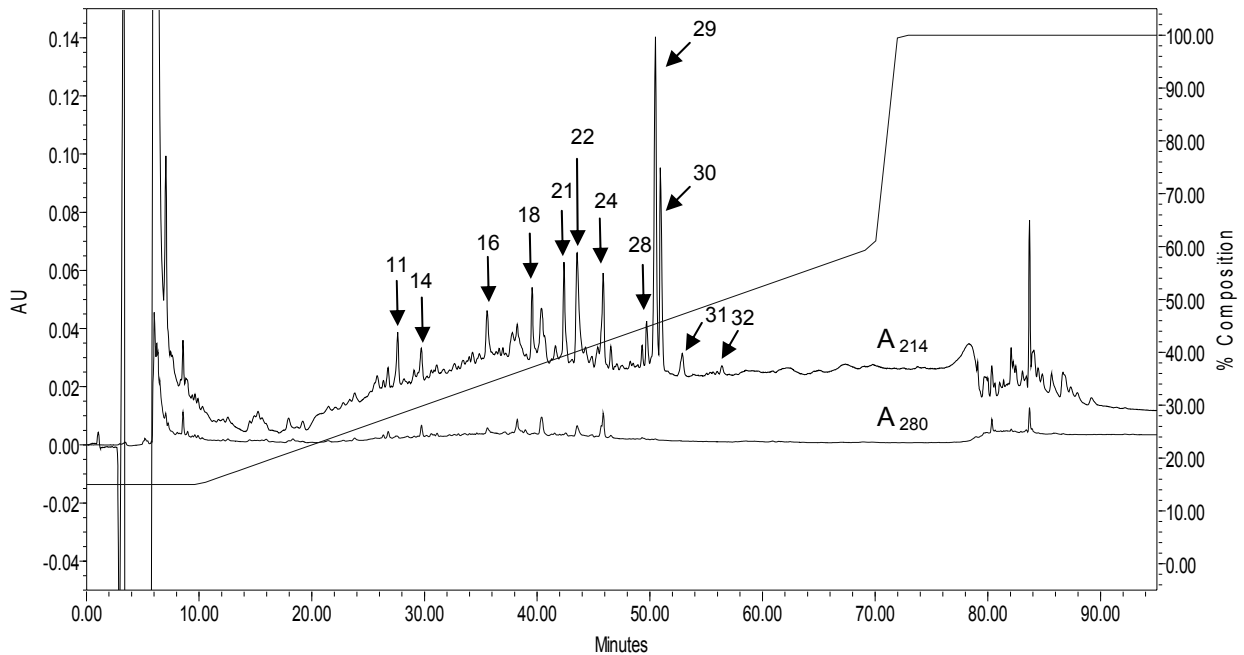


Figura 9 - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do *pool* catiônico 1 (PC1), obtido da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose do extrato solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas da variedade de berinjela “Florida Market”. A coluna foi equilibrada em 15,0% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente contínuo de acetonitrila (15 a 60 %), a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v). Os picos indicados por setas (18 e 24) foram analisados por espectrometria de massa. A separação foi monitorada pelos valores de A214 (linha superior) e A280 (linha inferior).

na região peptídica de interesse. (2 a 9 kDa) (Figura 10). Acredita-se tratar de peptídeos, possivelmente com atividade antimicrobiana, entretanto serão necessárias novas análises para confirmação. Para os outros picos dessa região, as análises por espectrometria de massa só permitiu identificar compostos com massas moleculares muito baixas (em torno de 800 Da), indicando poder ter havido degradação ou perda de peptídeos da amostra em alguma etapa da purificação ou realmente corresponderem a compostos de baixas massas moleculares. Em algumas amostras, houve a presença de muitos interferentes que acompanhavam os picos protéicos (Figura 10).

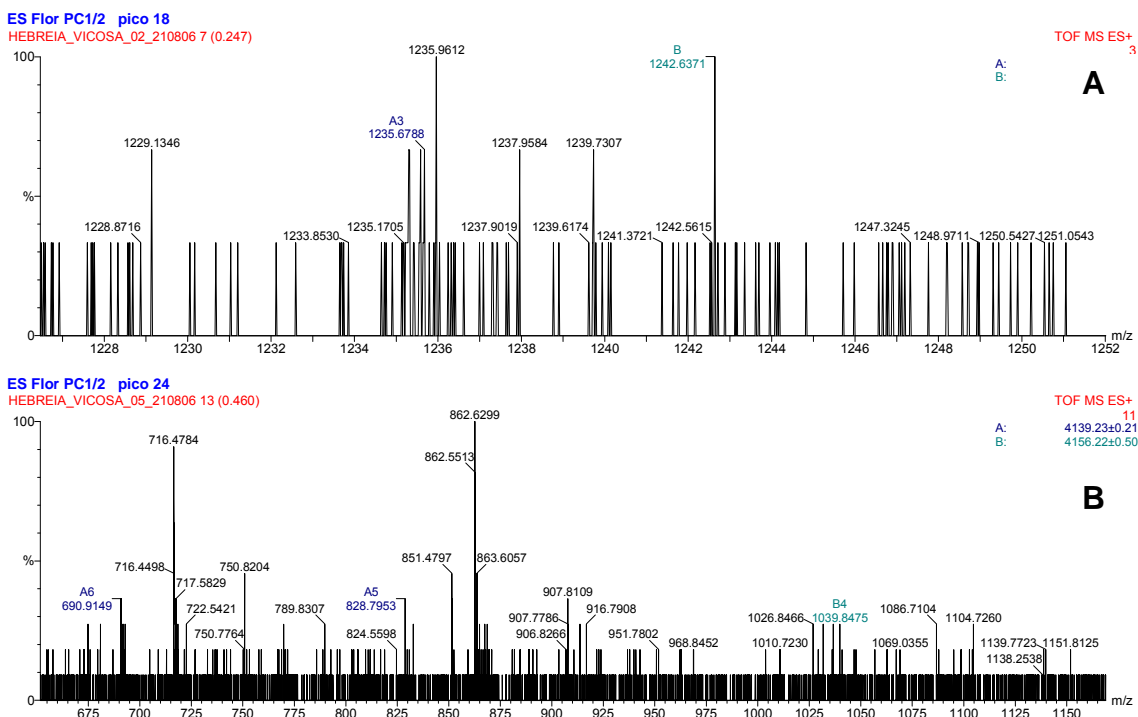


Figura 10 - Espectrometria de massa do pico 18 (A) e 24 (B), eluídos em 28 e 32,8 % de acetonitrila, respectivamente, na cromatografia de fase reversa (Figura 8) do *pool* catiônico 1 (PC1) da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose do extrato solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas da variedade de berinjela “Florida Market”.

Os peptídeos catiônicos, descritos na literatura, em geral, têm cerca de 50% dos resíduos aminoacídicos apolares, e são eluídos em concentrações de acetonitrila entre 20 e 40% (v/v) (Terras *et al.*, 1992; Almeida *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Fogaça *et al.*, 2004). No perfil de eluição (Figura 9), tal região corresponde ao tempo de eluição entre 20 e 57 min.

Esses materiais serão novamente submetidos a C18-RP-HPLC ou C4-RP-HPLC para purificação e novas análises por espectrometria de massa serão feitas na busca por peptídeos isolados. Assim estes resultados permitiram selecionar PC1 para a bioprospecção de peptídeos com alta atividade antibacteriana (Figuras 6 e 7) levando-se em consideração ainda a presença de peptídeos com massas moleculares inferior a 6.500 Da quando analisado por SDS-Tricina-PAGE nesta fração (Figura 8).

II.2.2. Purificação por Sephadex G-10 seguida por C18-RP-HPLC

Novos extratos peptídicos foram preparados a partir de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, conforme itens 3.3 e 3.4. Foi realizada a purificação parcial dos peptídeos presentes nos extratos por fracionamento com sulfato de amônio e aquecimento seletivo, conforme itens 3.5.1 e 3.5.2, obtendo-se ES e EP.

ES e EP foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular em coluna com resina Sephadex-G10, na tentativa de uma separação ocorrer simultaneamente a uma dessalinização. Após a primeira cromatografia do material proveniente do extrato solúvel, obteve-se a separação em uma primeira região que correspondeu ao *pool* 1 (frações 40 a 98) (Figura 11A) e as frações da segunda região foram reunidas e recromatografadas, sob as mesmas condições. A segunda cromatografia apresentou uma melhor separação, possibilitando a formação de mais três *pools*, os *pools* 2 (frações 31 a 68), 3 (69 a 154) e 4 (155 a 222) (Figura 11B). EP também foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 (Figura 12). As frações obtidas foram reunidas nos *pools* 1 (frações 46 a 70), 2 (71 a 114), 3 (154 a 196) e 4 (206 a 330).

Os oito *pools* recuperados, quatro para ES e quatro para EP, foram ultrafiltrados utilizando membrana de 1000 Da para assegurar que todas as frações estivessem dessalinizadas. Esse material foi então submetido a testes de atividade antimicrobiana contra as bactérias fitopatogênicas *R. solanacearum* (Figura 13) e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em microplacas (Figura 14). Todos os *pools* foram testados em duas concentrações diferentes, correspondentes a 0,75 e 1,5 g de peso fresco de material vegetal extraído.

As percentagens de inibição do crescimento das duas bactérias, relativas ao controle da cultura (ausência dos peptídeos, zero % de inibição) foram calculadas para o tempo de 16 horas de cultivo (Figuras 15 e 16).

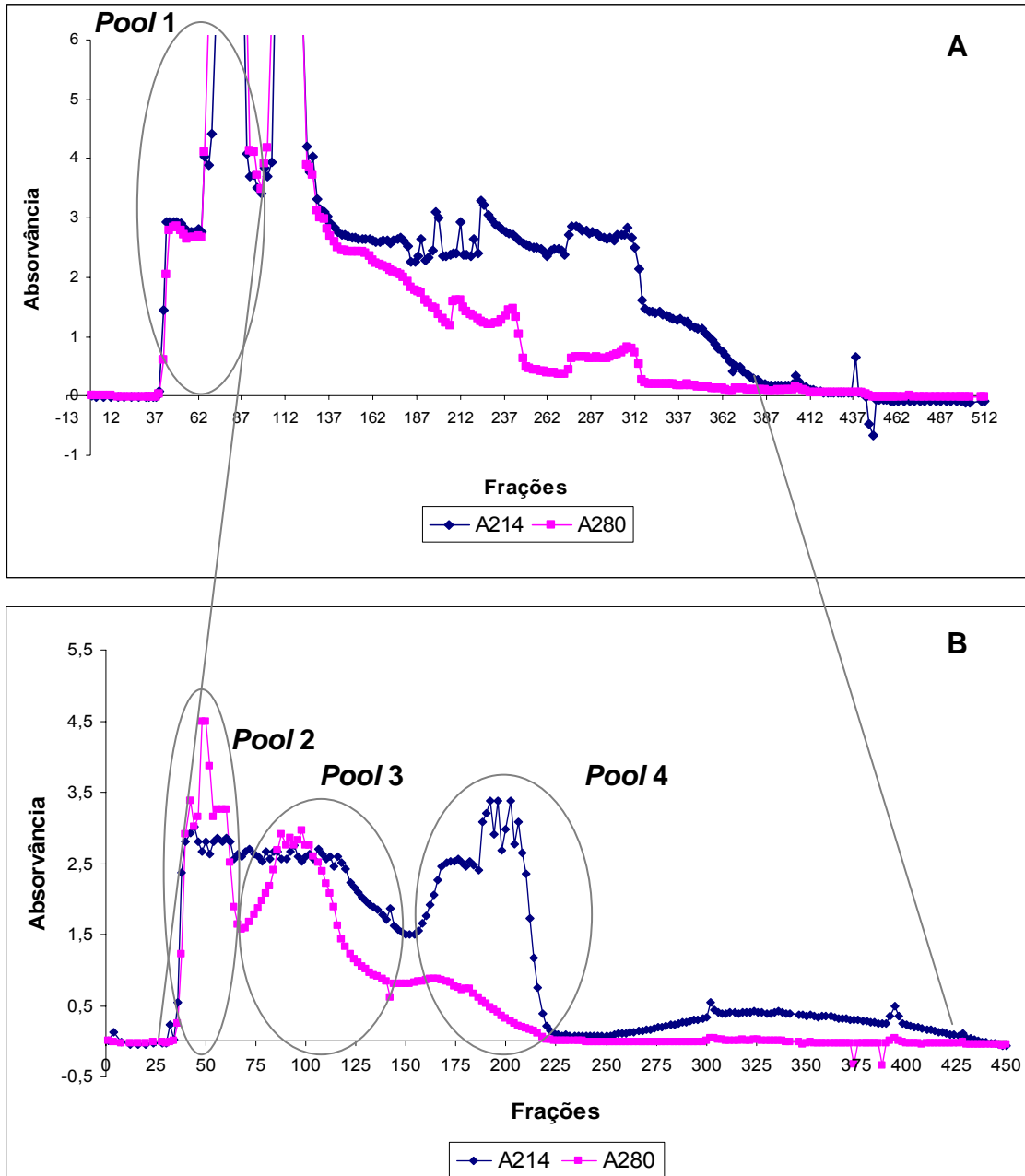


Figura 11 - Perfil cromatográfico da separação do Extrato de Solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas, de berinjela da variedade “Florida Market” em uma coluna Sephadex-G10. Foi recuperado o *pool 1* (frações 40 A 98) na primeira cromatografia (A) e as frações de 96 a 206 foram reunidas e reaplicadas na mesma coluna, sob as mesmas condições anteriores. Essa recromatografia forneceu os *pools 2* (frações 31 a 68), 3 (frações 69 a 154) e 4 (frações 155 a 222) (B). As separações foram desenvolvidas usando tampão Tris-HCl 5 mM pH 7,0, ao fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Foram coletadas frações de 1,3 mL em microtubos, que foram avaliadas a 280 e 214 nm.

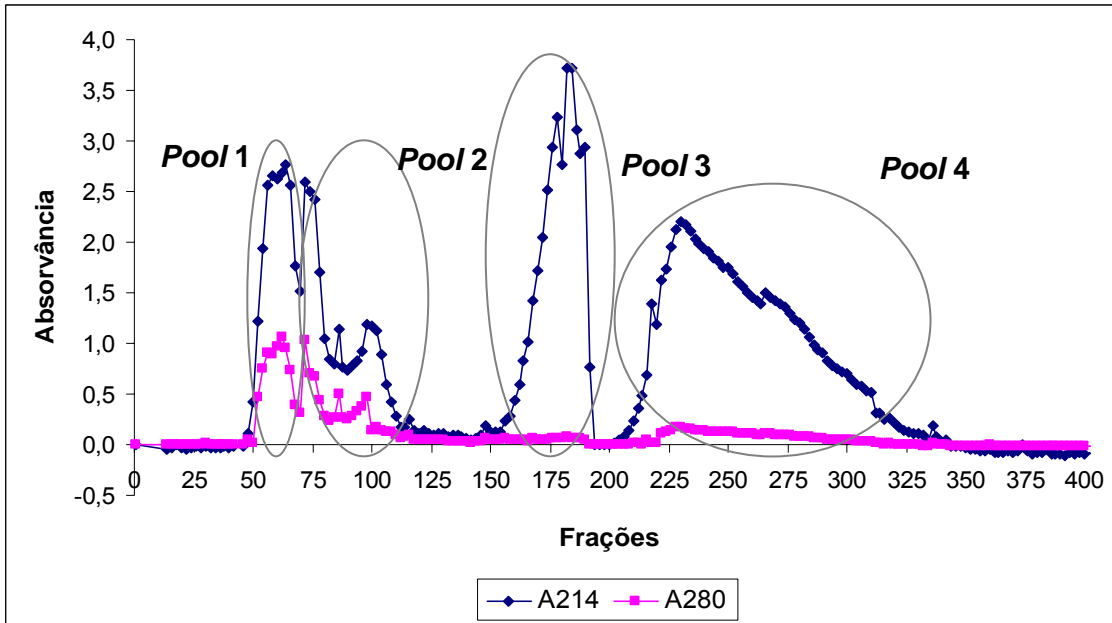


Figura 12 - Perfil cromatográfico da separação de Extrato de Parede Celular (EP) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market” em uma coluna Sephadex-G10. As frações foram reunidas em quatro *pools*. A separação foi desenvolvida usando tampão Tris-HCl 5 mM pH 7,0, ao fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Foram coletadas frações de 1,3 mL em microtubos, que foram avaliados a 280 e 214 nm e constituíram os *pools* 1 (frações 46 a 70), 2 (frações 71 a 114), 3 (frações 154 a 196) e 4 (frações 206 a 330).

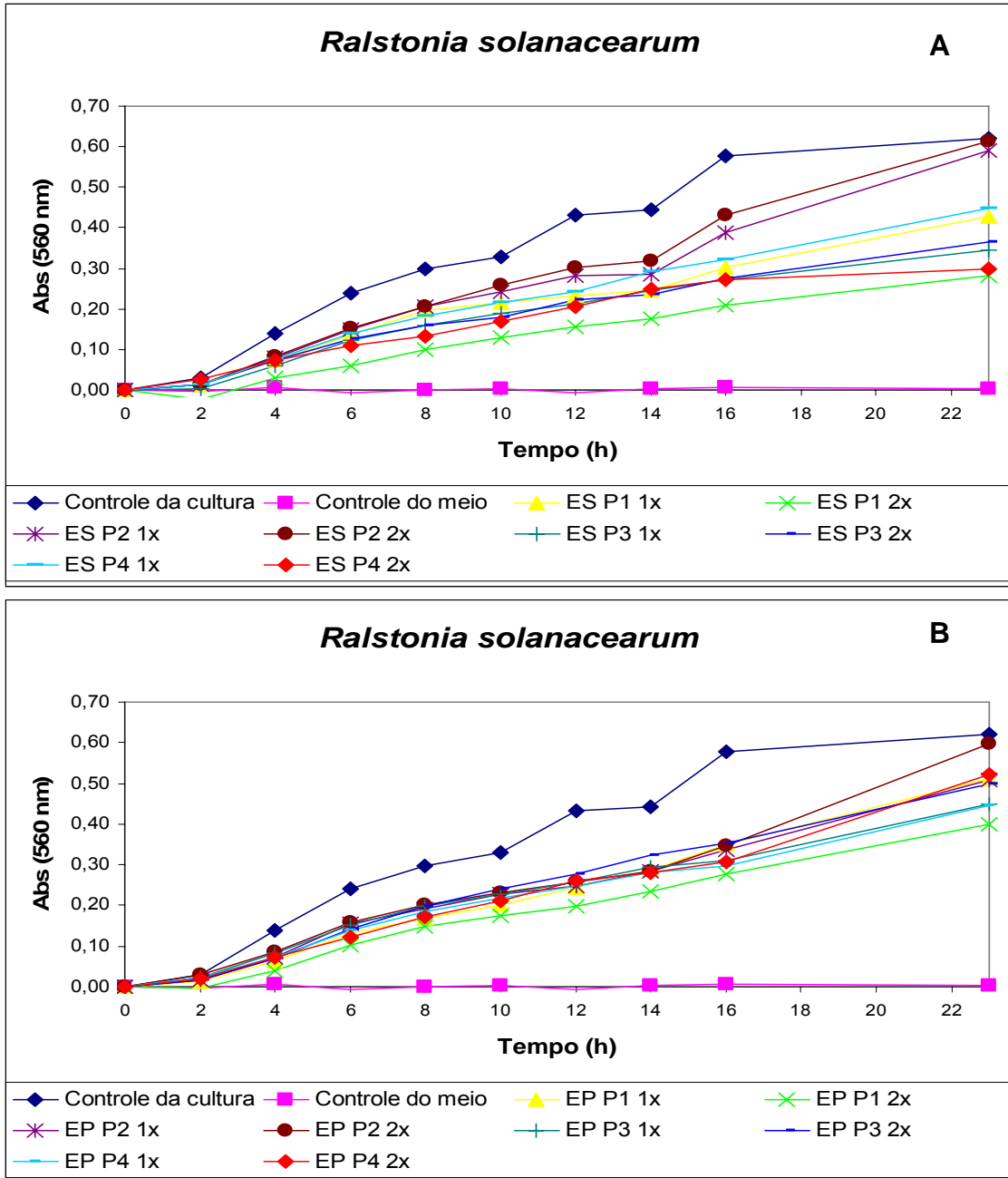


Figura 13 - Atividade antimicrobiana dos *pools* (P1, P2, P3 e P4) do extrato solúvel celular (ES) (A) e do extrato de parede celular (EP) (B) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, após cromatografia em Sephadex G-10, contra a bactéria *R. solanacearum*, avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas. O controle da cultura correspondeu ao cultivo da bactéria em ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria e dos extratos. Os *pools* foram avaliados em duas concentrações, sendo uma o dobro da outra.

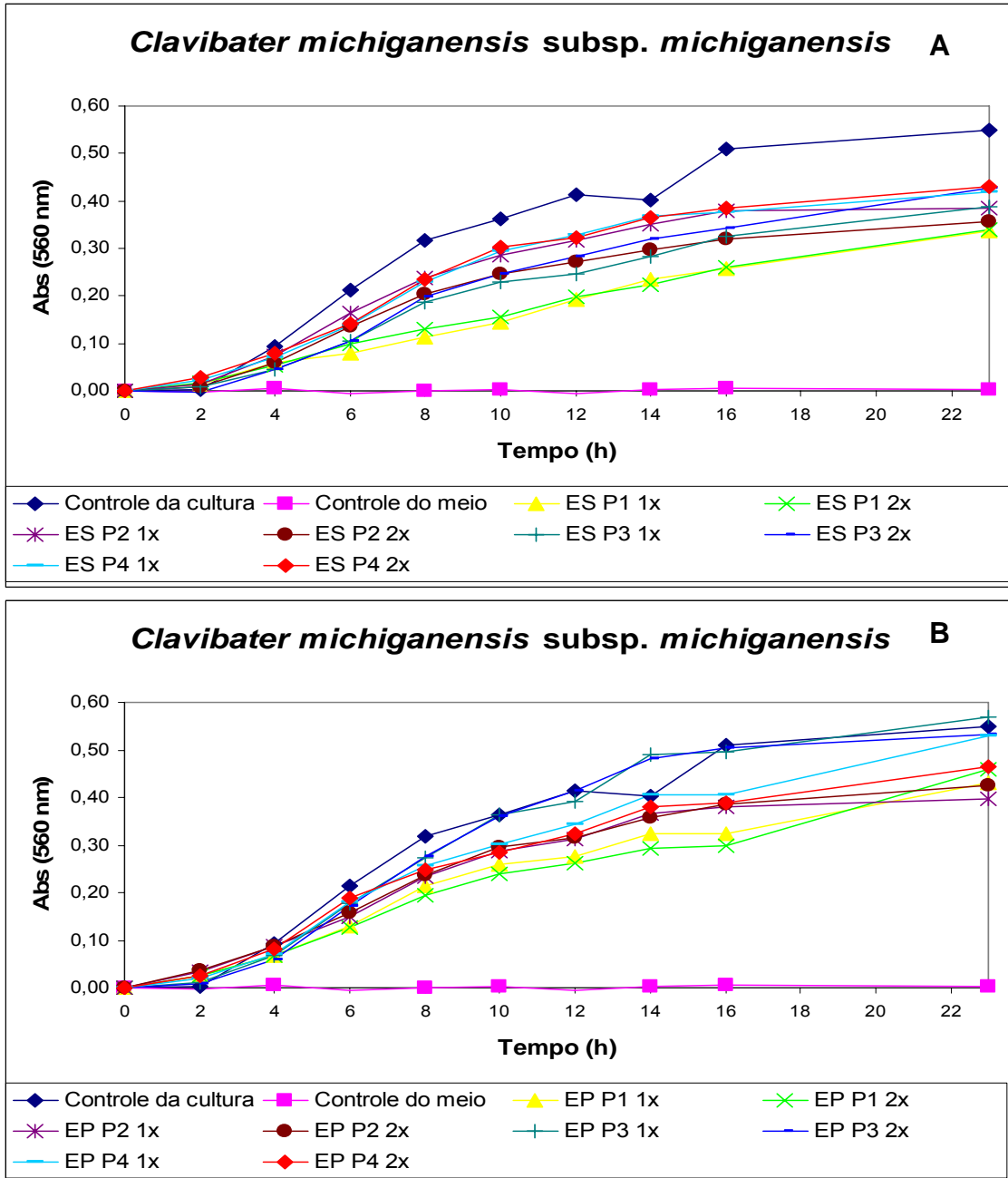


Figura 14 - Atividade antimicrobiana dos *pools* (P1, P2, P3 e P4) do extrato solúvel (ES) (A) e do extrato de parede celular (EP) (B) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, após cromatografia em Sephadex G-10 contra a bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas. O controle da cultura correspondeu ao cultivo da bactéria em ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria e dos extratos. Os *pools* foram avaliados em duas concentrações, sendo uma o dobro da outra.

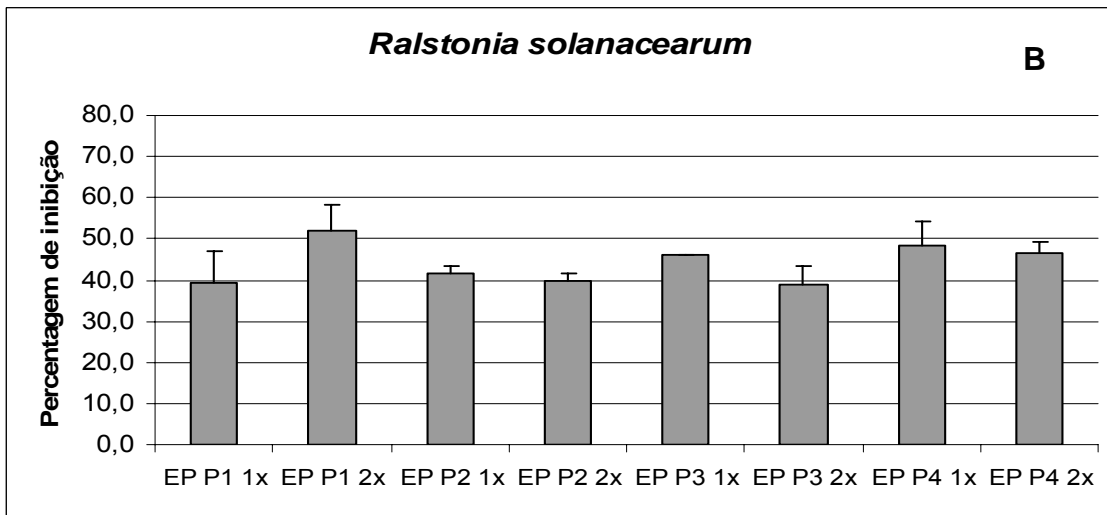
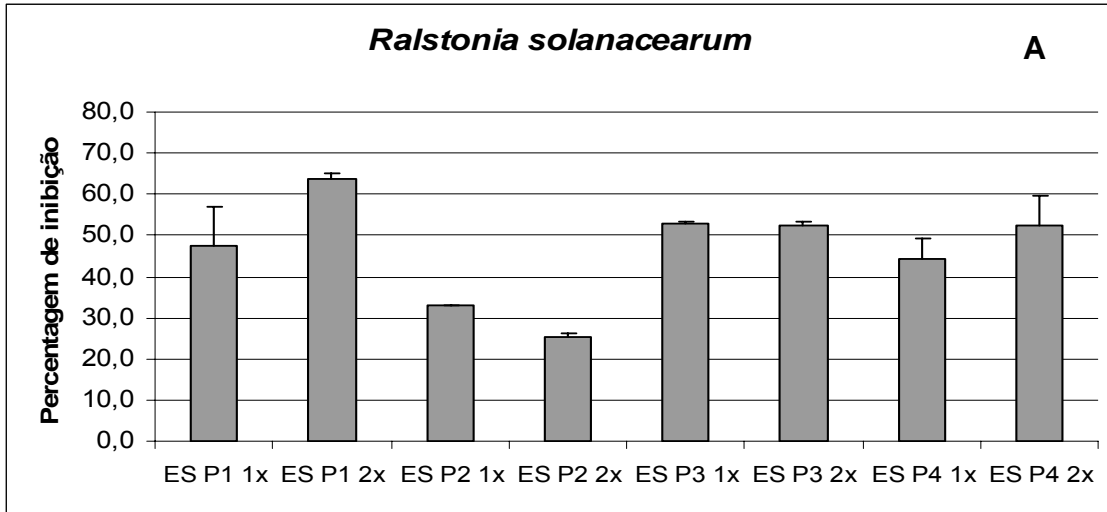


Figura 15- Percentagem de inibição dos *pools* (P1, P2, P3 e P4) do extrato solúvel (ES) (A) e do extrato de parede celular (EP) (B) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market” após cromatografia em Sephadex G-10 contra a bactéria *R.solanacearum*. As percentagens de inibição dos *pools* foram avaliadas em relação ao controle da cultura (cultivo na ausência de frações peptídicas, zero % de inibição, dados não apresentados). O controle do meio de cultura correspondeu ao meio não inoculado (100 % de inibição, dados não apresentados). As barras indicam o desvio padrão mostrando apenas o limite superior.

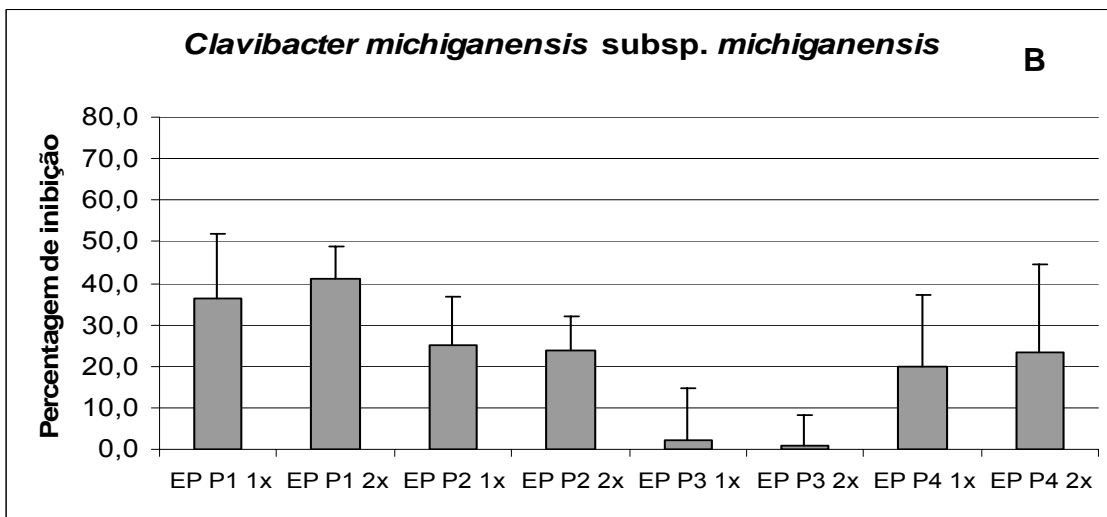
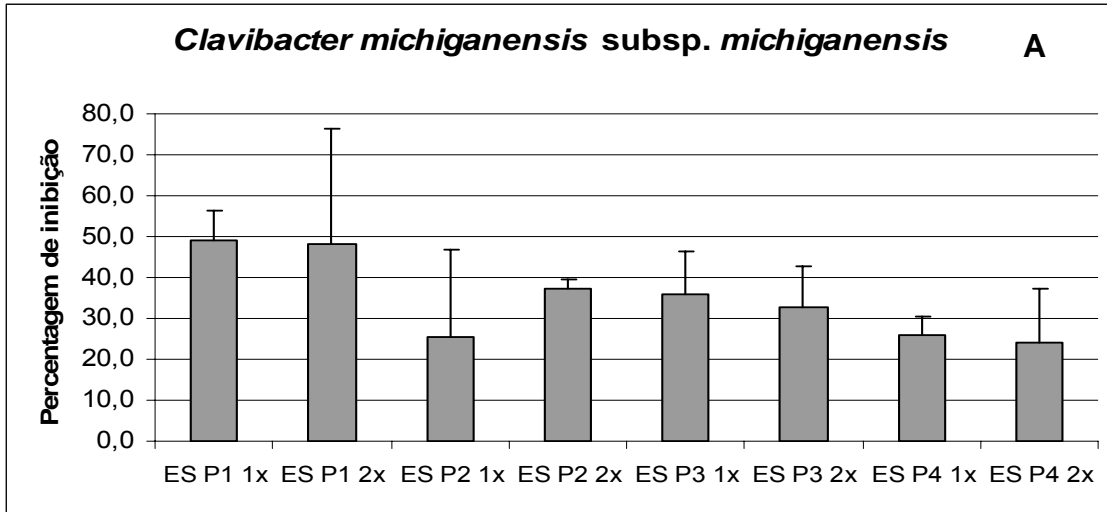


Figura 16- Percentagem de inibição dos *pools* (P1, P2, P3 e P4) do extrato solúvel (ES) (A) e do extrato de parede celular (EP) (B) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market” após cromatografia em Sephadex G-10 contra a bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. As percentagens de inibição dos *pools* foram avaliadas em relação ao controle da cultura (cultivo na ausência de frações peptídicas, zero % de inibição, dados não apresentados). O controle do meio de cultura correspondeu ao meio não inoculado (100 % de inibição, dados não apresentados). As barras indicam o desvio padrão mostrando apenas o limite superior.

Os diferentes *pools* mostraram grau de inibição variável para as bactérias testadas. De modo geral, *R. solanacearum* mostrou-se mais susceptível aos efeitos dos inibitórios de ambos os extratos, para os *pools* avaliados. Tanto para ES quanto

para EP, o *pool* 1 mostrou-se mais efetivo na inibição do crescimento de ambas as bactérias, em geral para a maior concentração utilizada, atingindo mais de 60 % de inibição para ES *pool* 1 2X. Para os *pools* 2, 3 e 4, no geral, a atividade inibitória foi observada, porém houve maior inibição dos crescimentos bacterianos para as menores concentrações utilizadas (1X), quando comparados com a maior (2X). Sabe-se que essas frações são extratos parcialmente purificados, de forma que podem possuir tanto compostos inibidores quanto compostos ativadores, que poderiam fornecer por exemplo carbono ou agentes ativadores do crescimento, e assim favorecer a multiplicação das bactérias. Além disso, a presença de hormônios e/ou fatores de crescimento vegetais podem também ser responsáveis pelo crescimento bacteriano. Assim, ensaios com maior concentração desses extratos estão mais enriquecidos desses compostos, podendo assim haver um mascaramento do efeito inibitório de moléculas antimicrobianas presentes nos extratos. Não foi possível observar uma correlação clara e direta entre a concentração do extrato e a inibição do crescimento das bactérias. O *pool* 3 proveniente de EP mostrou-se efetivo no controle de *R. solanacearum*, mas pouco efetivo contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, sugerindo que podem apresentar graus variados de inibição para as diferentes bactérias. Assim, EP *pool* 1 foi mais efetivo no controle da bactéria Gram-negativa do que da Gram-positiva avaliada. Essa maior especificidade por determinada classe de patógeno já foi descrita para peptídeos caracterizados de diferentes fontes (Hancock, 2001; Reddy *et al.*, 2004).

As frações coletadas da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 de ES obtido de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market” (Figura 11A) foram concentradas e submetidas à eletroforese por SDS-Tricina-PAGE de três fases, revelado por Coomassie Brilliant Blue para identificar quais frações estão enriquecidas em peptídeos. A avaliação da região entre as frações 52 a 180 (Figura 17) permitiu observar que a fração 52 parece estar

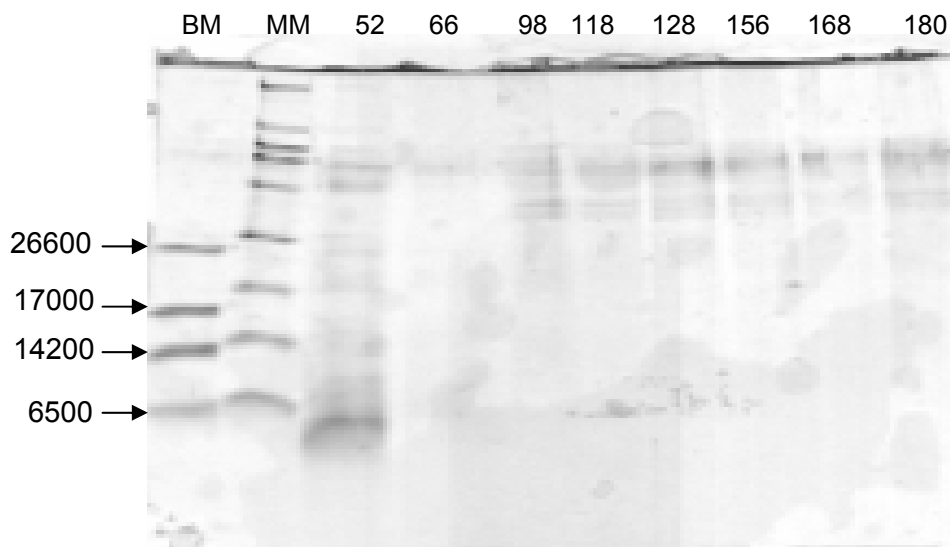


Figura 17 - SDS-Tricina-PAGE de três fases de extrato solúvel (ES) após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”. O gel foi revelado por Coomassie Brilliant Blue. As amostras foram: **BM**: padrão de massa molecular de baixa faixa (estão indicadas as massas), 5 μ L; **MM**: padrão de massa molecular de ampla faixa, 5 μ L; Frações 52, 66, 98, 118, 128, 156, 168 e 180.

enriquecida em peptídeos com massas moleculares inferiores a 6.000 Da. Uma possível explicação para que moléculas de baixa massa molecular estejam sendo eluídas no início da cromatografia de exclusão molecular seria a possível ocorrência de aglomeração dos peptídeos, associação que só seria desfeita quando eles fossem submetidos às condições desnaturantes da eletroforese. Deve-se lembrar que, de acordo com a literatura, muitos peptídeos antimicrobianos apresentam 50 % de resíduos hidrofóbicos (Hancock *et al.*, 2000), e que a etapa de aquecimento seletivo pode ter favorecido a exposição desses resíduos e a associação das moléculas.

Tendo sido a fração 52 totalmente utilizada no gel, as frações 51 e 53 foram reunidas, concentradas e aplicadas em cromatografias de fase reversa, utilizando-se a coluna C_{18} (C18-RP-HPLC) (Figura 18). Os picos eluídos em concentrações entre 20 e 40 % de acetonitrila, compatíveis com a eluição de peptídeos antimicrobianos já descritos, foram analisados por espectrometria de massa. Na Figura 17 estão

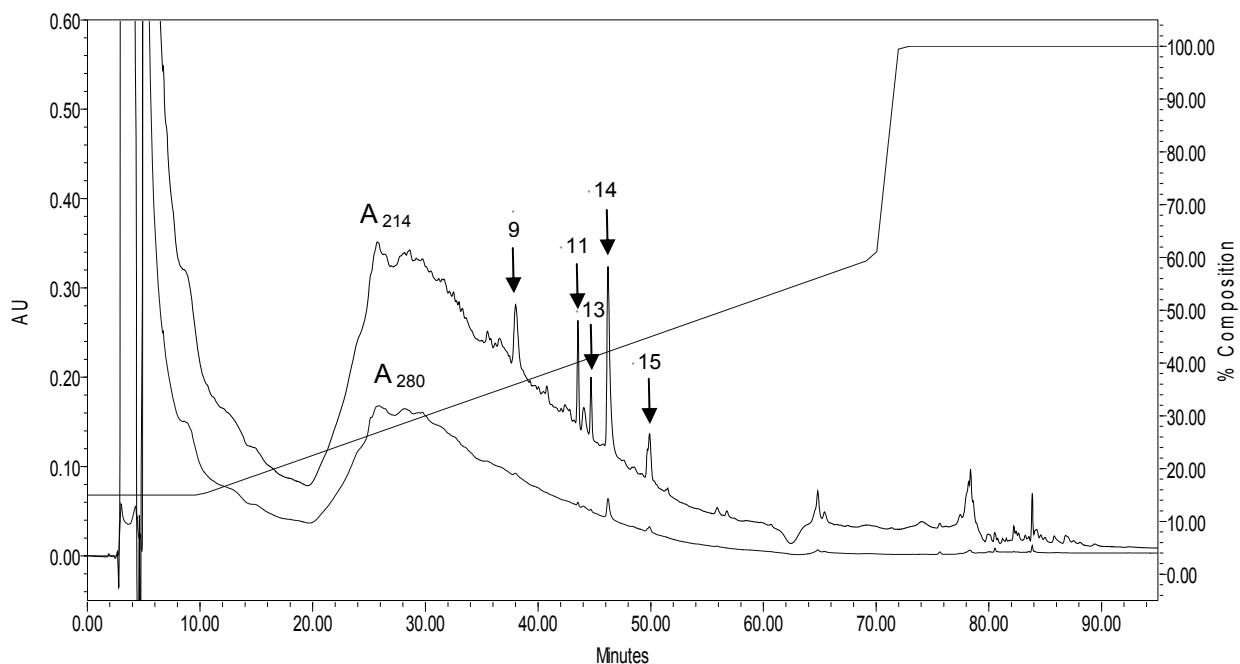


Figura 18 – Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel (ES) após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”. A coluna foi equilibrada em 15 % do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo de acetonitrila (15 a 60 %), a um fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Solvente A: TFA 0,1 % (v/v); solvente B: TFA 0,1 % (v/v) e acetonitrila 80 % (v/v). Os picos indicados por setas (9, 11, 13, 14 e 15) foram analisados por espectrometria de massa e foi identificada a presença de moléculas com baixa massa molecular. A separação foi monitorada pelos valores de A_{214} (linha superior) e A_{280} (linha inferior).

indicados por setas aqueles picos em que foram identificadas massas moleculares na região peptídica.

Do material proveniente do pico 9, obteve-se uma massa molecular de 3.705,81 Da (Figura 19). Nesse material foi possível observar padrões isotópicos muito nítidos (Figura 19 B) e pouco ruído foi observado. Esse material foi submetido à seqüenciamento pelo método de degradação de Edman automatizado. A seqüência obtida com 22 resíduos aminoácidos foi VNXEEHXLRGaTVHQaQPLATa mas a determinação dos resíduos para as posições 1, 10 e 17 não foram evidentes. O resíduo indicado por X pode ser Cys e o indicado por “a” não pode ser identificado

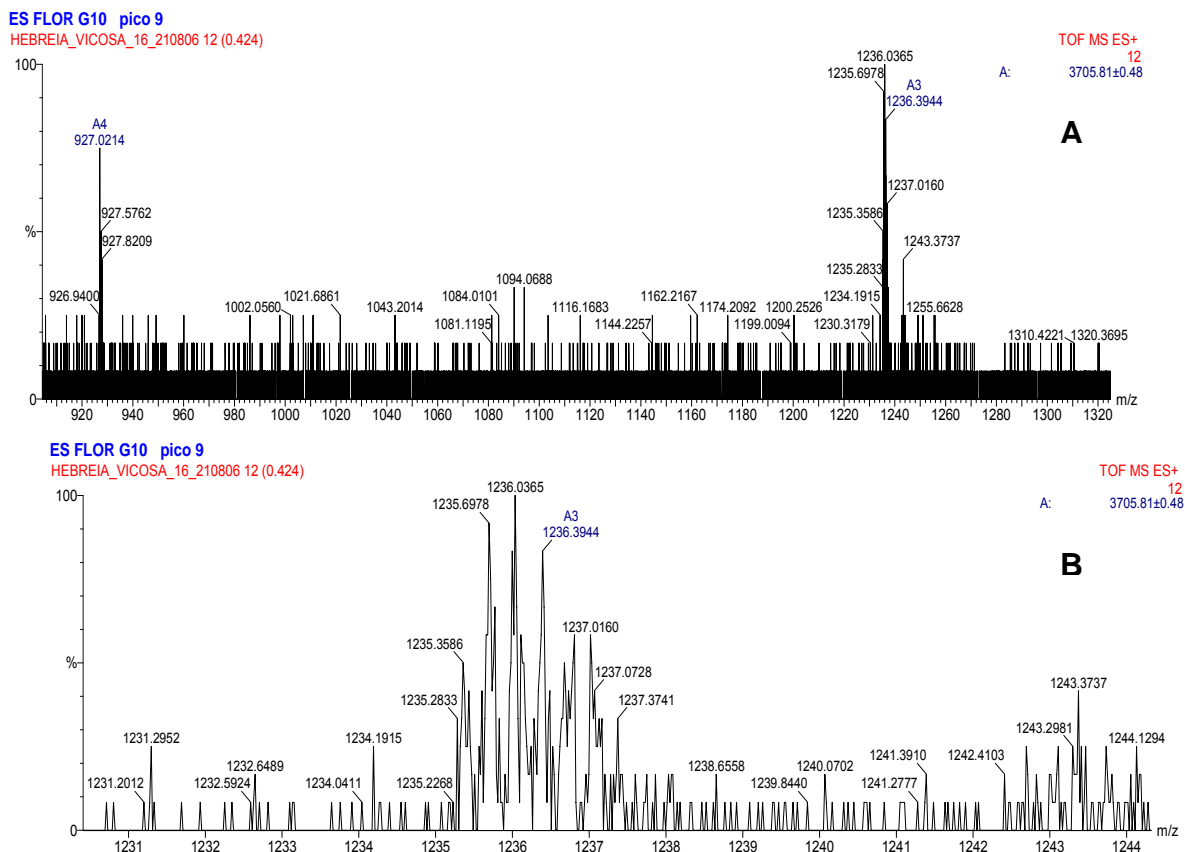


Figura 19 - A) Espectrometria de massa do pico 9 eluído em 29,6 % de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 18) das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel (ES) após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas da variedade de berinjela “Florida Market”. **B)** A região em que foi identificada a molécula com três ionizações foi expandida, evidenciando o padrão isotópico encontrado

pois ocorreu um erro no equipamento de modo geral. Dessa forma, serão necessárias novas análises para confirmar a seqüência obtida.

Nos picos 11, 13 e 15, também foram identificadas moléculas com massas moleculares baixas (Figura 20). As massas moleculares detectadas foram: para o pico 11, 5.440,76 e 5.463,14, 1.573,48 e 1.397 Da; para o pico 13, 5.496,90 e 4.140,59 Da; para o pico 15: 4.389 e 3.924 Da. Esses materiais estão reservados para a realização de novas etapas de purificação e análises de seqüenciamento de aminoácidos no peptídeo, visando identificar similaridade de seqüência com peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura.

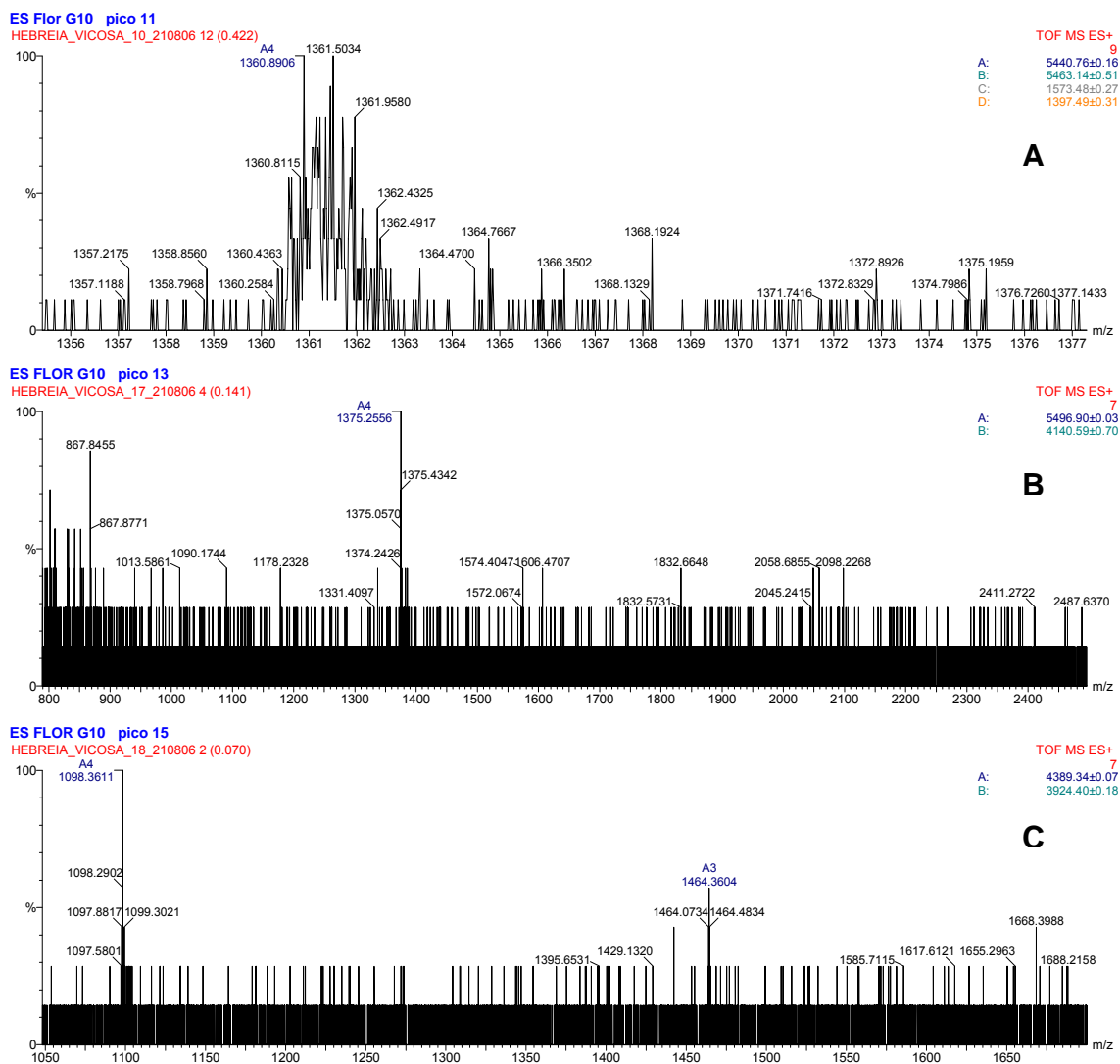


Figura 20 - Espectrometria de massa dos picos 11 (A), 13 (B) e 15 (C) eluídos em 32, 33,6 e 39,2 % de acetonitrila, respectivamente, na cromatografia de fase reversa (Figura 18) das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel (ES) após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”.

O pico 14, quando submetido à análise por espectrometria de massa, apresentou moléculas com massa molecular de 4.156,06 e 4.179,21 Da (Figura 21). Nesse material os padrões isotópicos formados também estavam muito nítidos (Figura 21B). Esse pico será novamente separado por C18-RP-HPLC para então ser submetido à seqüenciamento.

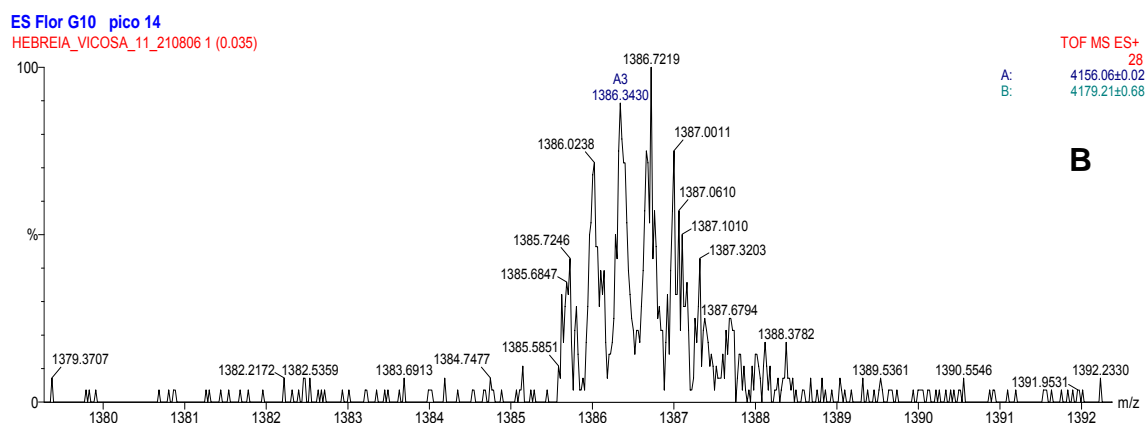
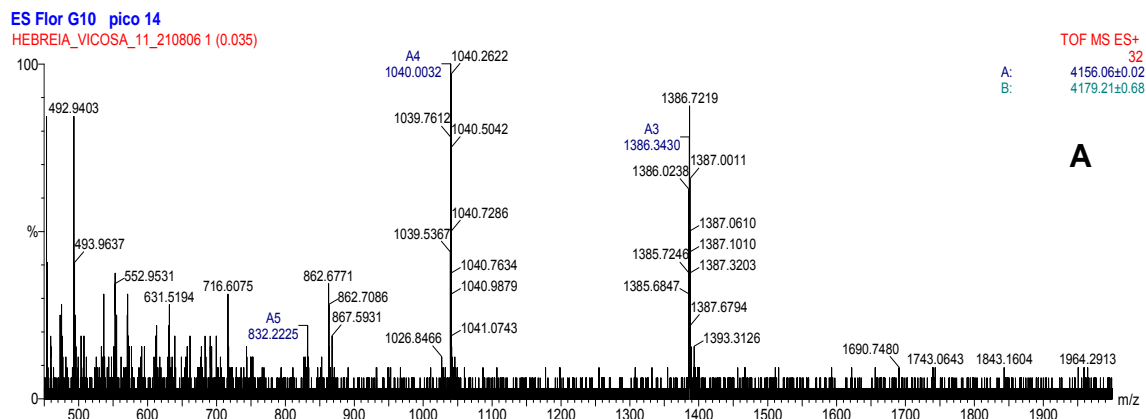


Figura 21 - Espectrometria de massa do pico 14 eluído em 35,2 % de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 18) das frações 51 e 53 obtidas de extrato solúvel (ES) após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 das folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”. Em B, a região em que foi identificada a molécula com três ionizações foi expandida, evidenciando o padrão isotópico encontrado.

II.3. Conclusões

Os protocolos de extração e purificação permitiram a separação de peptídeos com atividade antimicrobiana, embora algumas frações necessitem ainda de melhor separação. Esses testes de atividade contra bactérias fitopatogênicas mostraram que o *pool* catiônico 1 (PC1) proveniente de ES de folhas totalmente expandidas de berinjela parece concentrar compostos com características antimicrobianas. Esse *pool* inibiu parcialmente (até 60 %) o crescimento das bactérias fitopatogênicas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram-positiva) e *Ralstonia solanacearum* (Gram-negativa). A inibição foi dependente de concentração, entretanto não foi possível identificar se há correlação direta entre a concentração do agente e a capacidade inibidora, pois a possível presença de compostos ativadores do crescimento bacteriano interfere com o efeito antimicrobiano observado. A presença de peptídeos ficou evidenciada em várias frações analisadas, tanto pela visualização em SDS-Tricina-PAGE quanto pela análise por espectrometria de massa. Apenas uma seqüência peptídica parcial foi identificada até o momento, por questões de factibilidade e uso de equipamentos fora da UFV. Outras frações contendo peptídeos terão sua purificação refinada e as moléculas serão seqüenciadas.

Os *pools* provenientes do material de ES e EP, após submetidas a cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10, mostraram inibição variável para as bactérias testadas. De modo geral, *R. solanacearum* mostrou-se mais susceptível aos efeitos dos extratos, sendo que o *pool* 1 de ES, na maior concentração testada, provocou uma inibição do seu crescimento superior a 60%.

Não foi possível observar uma correlação clara entre a concentração do extrato e a inibição do crescimento das bactérias, mas vale ressaltar que esse extratos são parcialmente purificados, de forma que podem possuir tanto compostos inibidores quanto compostos ativadores do crescimento bacteriano que podem fornecer por exemplo carbono, e assim favorecer o crescimento das bactérias. Além disso, a presença de hormônios de crescimento vegetais poderiam estar favorecendo o crescimento bacteriano.

Frações desse extrato foram analisadas por espectrometria de massa e foram identificados dez valores de massas moleculares peptídicas, que estão na região de interesse (2 a 9 kDa). Obteve-se uma sequência aminoacídica até o momento a partir desse material, mas essa necessita ser confirmada.

Peptídeos antimicrobianos identificados serão caracterizados com o objetivo de serem utilizados como princípios ativos no desenvolvimento de defensivos naturais para culturas afetadas por patógenos de difícil controle, e ainda utilizados como agentes antimicrobianos para animais nas indústrias farmacêuticas e veterinária. Esses compostos, ou parte deles, poderão ser sintetizados artificialmente, com base nas estruturas peptídicas identificadas a partir de compostos naturais, e esses não devem ser degradáveis pelos microrganismos.

Aplicação biotecnológica agropecuária dos extratos peptídicos

III.1. Introdução

A redução da produtividade em uma lavoura pode ser ocasionada por diversos fatores. A ocorrência de doenças fúngicas, bacterianas, viróticas e nematoses é uma das principais causas, podendo levar à perda total de uma cultura devido a danos causados tanto na parte aérea quanto no sistema radicular das plantas (Motoyama *et al.*, 2003).

A murcha bacteriana é uma das doenças de origem bacteriana mais importantes no mundo, afetando várias espécies de plantas pertencentes a mais de 44 famílias botânicas (Hayward, 1991), entre as quais, a família das solanáceas é a mais severamente afetada, sofrendo grandes perdas econômicas em culturas como batata, tomate e fumo. A murcha bacteriana é amplamente distribuída em todos os grandes continentes, ocorrendo na maioria das regiões tropicais, subtropicais e quentes temperadas (Hayward, 1994).

Ralstonia solanacearum é um patógeno que causa infecção vascular e murcha. O aparecimento da murcha, inicialmente nas folhas superiores, ocorre dentro de poucos dias nas plantas infectadas, em condições favoráveis à doença (Akiew e Trevorrow, 1994). As seções longitudinais do caule de plantas infectadas apresentam fluxo bacteriano caracterizado por exsudação de pus (Ferreira e Salgado, 1995; Agrios, 1997). As plantas infectadas que sobrevivem à murcha bacteriana apresentam nanismo, amarelecimento das folhas murchas e, às vezes, estrias escuras são formadas ao longo do caule e pecíolos (Goto, 1992). Entretanto, a expressão dos sintomas varia com o hospedeiro e com as condições ambientais.

O estabelecimento de medidas de controle da murcha bacteriana é difícil devido à complexidade de sobrevivência no solo e ao largo círculo de hospedeiros da bactéria, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis à doença (Takatsu e Lopes, 1997; Lopes e Reifschneider, 1999).

O prejuízo mundial para a agricultura causado por nematóides foi estimado recentemente ser de 125 bilhões de dólares por ano (Chitwood, 2003), sendo os

nematóides do gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematóides das galhas, considerados os mais prejudiciais à agricultura pois causam uma perda estimada em 100 bilhões de dólares por ano (Oka *et al.*, 2000). Tais perdas refletem em prejuízos para o produtor e em um conseqüente aumento de preço para o consumidor (Freitas *et al.*, 2001).

O controle de nematóides é muito complexo. O controle por meio de resistência genética, embora desejável, é limitado pela escassez de cultivares resistentes e pela quebra de resistência em temperaturas de solo superiores a 28°C (Dropkin, 1969), o que pode acontecer freqüentemente em nosso tipo de clima. A rotação de cultura para o nematóides das galhas é praticamente impossível devido à ampla gama de hospedeiros que as principais espécies de *Meloidogyne* possuem. O controle químico propicia uma proteção temporária e sua adoção contínua pode acarretar o surgimento de patógenos resistentes aos produtos utilizados (Ghini e Kimati, 2000). Além disso, houve uma proibição total ou permissão ao uso restrito da maioria dos nematicidas devido aos danos causados por eles tanto ao homem quanto ao meio ambiente (Zuckerman e Esnard, 1994; Nico *et al.*, 2004).

Tais efeitos têm estimulado a busca por formas alternativas de controle de doenças de plantas (Nakasone *et al.*, 1999). O controle alternativo de doenças pode ser realizado através do controle biológico e da indução de resistência pela utilização de moléculas ou substâncias elicitoras, podendo ser de origem abiótica ou biótica. Dentre estas últimas, pode-se citar o uso de extratos vegetais e de óleos essenciais (Stangarlin *et al.*, 1999; Motoyama *et al.*, 2003).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade de extratos enriquecidos em peptídeos obtidos de folhas de berinjela da variedade “Florida Market” contra *Ralstonia solanacearum* infectando tomateiros e contra o fitonematóide *Meloidogyne incognita* em ensaio realizado *in vitro*.

III.2. Resultados e Discussão

Na Figura 22 estão esquematizados as diferentes frações peptídicas parcialmente purificadas de folhas de berinjela que foram utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana para auxiliar no acompanhamento das etapas do trabalho.

III.2.1. Avaliação da inativação ou morte de juvenis de nematóides por extratos peptídicos de folhas de berinjela.

Depois de realizada nova extração de peptídeos a partir de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, os extratos solúveis brutos (ESB) e de parede celular bruto (EPB) foram submetidos seqüencialmente à purificação por precipitação com sulfato de amônio e aquecimento seletivo, conforme itens 3.5.1 e 3.5.2. A seguir, os extratos foram ultrafiltrados em membrana de 1000 Da, concentrados e ressuspensos em água ultrapura, obtendo-se os denominados extratos solúveis (ES) e extratos de parede celular (EP).

O material dessalinizado foi submetido à cromatografia aniônica em coluna Q-Sepharose (Figura 5A), conforme item 3.5.3. Foram obtidos três *pools* catiônicos, denominados PC1, PC2 e PC3 e um *pool* aniônico, denominado PA. Todos os *pools* foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana contra *R. solanacearum* (Figura 6A) e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 6B). Esses testes de atividade contra bactérias fitopatogênicas, descritos no item 3.7.1, mostraram que o PC1 parece concentrar compostos com características antimicrobianas.

Dessa forma, foi feito um ensaio para avaliar se PC1 possui também alguma atividade contra fitonematóides. Para isso, foram usadas três concentrações de PC1, referentes a 1 g, 2 g e 3 g de folhas frescas usadas para o preparo do extrato, conforme itens 3.3, 3.4, 3.5.1 e 3.5.2. As frações foram concentradas a 1 mL e incubadas em placas de Petri juntamente com, aproximadamente, 200 juvenis de *Meloidogyne incognita*. O controle correspondeu à adição de 1 mL de água em placas contendo os juvenis. Foi feita a contagem em 24 e 48 horas após a montagem do experimento, e então os juvenis foram lavados, finalmente incubados por mais 24 horas e, finalmente, contados. A contagem final teve o objetivo de avaliar se o efeito

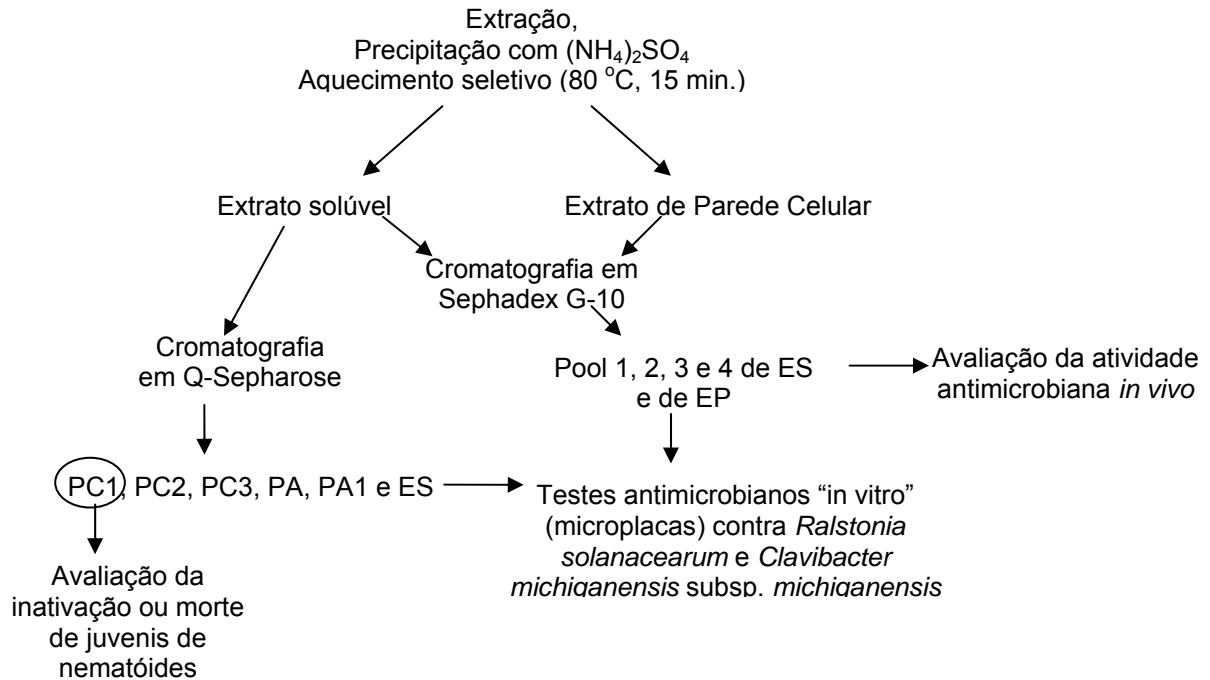


Figura 22 - Fluxograma indicando os diferentes pools utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.

do extrato é nematostático, atuando na paralisação do movimento dos juvenis, ou se é nematicida, que provoca a morte dos fitonematóides.

A contagem em 72 horas indicou a não recuperação do movimento dos juvenis mesmo depois de retirado o agente inibidor (Figura 23), sugerindo um efeito nematicida e não nematostático. Esse resultado é de alta relevância, considerando ser o seu controle tarefa de difícil realização (Campos, 1992) e os grandes prejuízos causados na agricultura por esses fitoparasitas, envolvendo queda na produção total e na qualidade do produto colhido. Vários autores (Noling e Becker, 1994; Zuckerman e Esnard, 1994; Nico *et al.*, 2004) apontaram a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos de controle de nematóides podendo esse extrato ser, futuramente, utilizado com essa finalidade. Deve-se salientar que esta fração foi anteriormente apontada como enriquecida em peptídeos, que poderiam corresponder a princípios ativos para o desenvolvimento de agentes de defesa naturais.

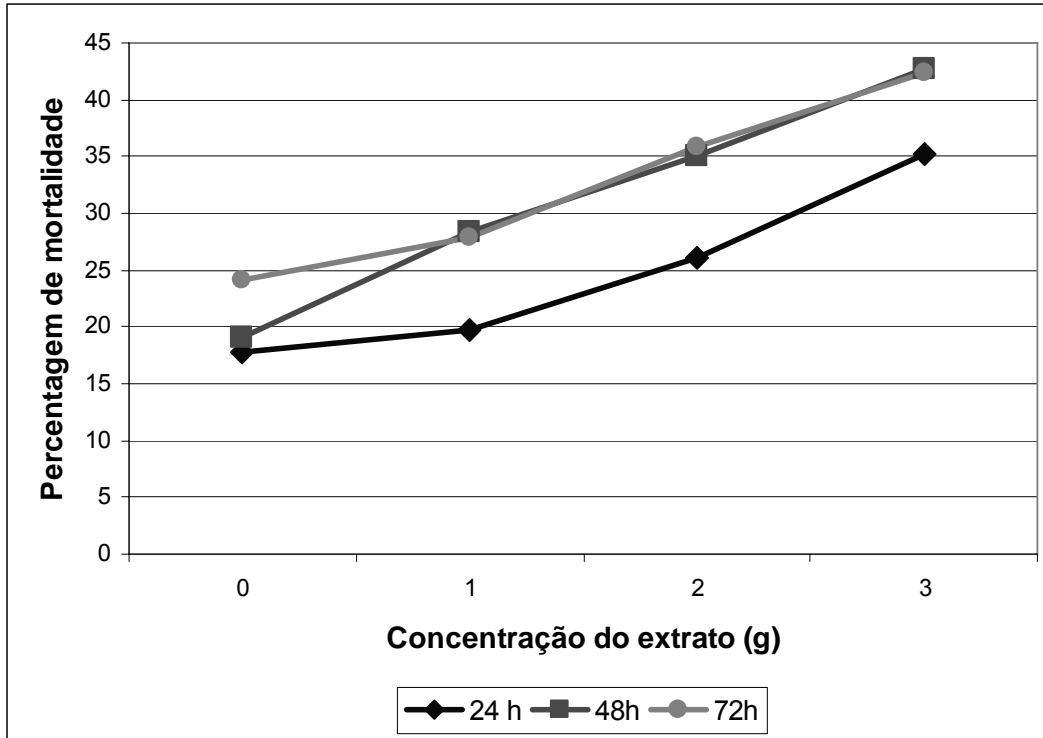


Figura 23 - Percentagem de mortalidade de nematóides tratados com o *pool* catiônico (PC1) obtido do extrato solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de berinjela da variedade “Florida Market”, em três concentrações diferentes (1, 2 e 3 g de folhas frescas). A percentagem de mortalidade foi calculada com base na relação [(número de juvenis imóveis/(número de juvenis imóveis+juvenis móveis)] x 100. O número de juvenis foi avaliado em 24 e 48 horas após a montagem do experimento e, depois de lavados, os nematóides foram incubados por 24 horas e recontados (72 horas a partir da montagem do experimento). O controle correspondeu à ausência do extrato peptídico, que foi substituído por água. As barras indicam o desvio padrão.

A presença da fração enriquecida em peptídeos causa um efeito na relação de juvenis imóveis, dependente da concentração do agente antimicrobiano de forma que, com o aumento da concentração do *pool* PC1, a percentagem de mortalidade aumenta (Figura 23).

Nematóides apenas em água (0 g) apresentaram perda de movimento, possivelmente por envelhecimento dos nematóides, entretanto, o efeito do produto sobre os nematóides está evidenciado claramente quando observa-se que a

mortalidade cresce acentuadamente com o aumento da concentração da fração enriquecida dentro de um mesmo período de tempo.

III.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo* dos extratos de folhas de berinjela

A separação de ES ou de EP em Sephadex G-10 gerou quatro *pools*, denominados *pools* 1, 2, 3 e 4 (itens 3.3, 3.4, 3.5.1, 3.5.2, e 3.5.4). Parte desse material foi utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana desses extratos *in vitro* (item 3.7.1) e *in vivo* utilizando plantas de tomate. Os quatro *pools*, tanto para ES quanto para EP, foram ultrafiltrados utilizando membrana de 1000 Da, para assegurar que todas as frações estivessem dessalinizadas. Esse material foi inicialmente submetido a teste de atividade antimicrobiana *in vitro* contra as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* (Figura 13) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em microplacas (Figura 14), e os resultados mostraram-se, em sua maioria, promissores para a bioprospecção de peptídeos antimicrobianos. Dessa forma, a atividade antimicrobiana desses materiais foi avaliada em um teste *in vivo*, utilizando-se tomateiros infectados por *R. solanacearum*. As mudas de tomateiro do cultivar Santa Clara tiveram suas raízes lavadas e imersas nos extratos de folhas de berinjela, tendo sido a seguir transplantadas para copos preenchidos com areia saturada com a suspensão bacteriana (item 3.8). Foram feitos controles prévios nos quais água substituiu o material vegetal, que foram submetidos a todas as etapas de extração e purificação, visando testar se compostos presentes nessas etapas pudessem ser tóxicos para as plantas (Figura 24). Foram coletadas as frações que foram agrupadas em *pools* de forma correspondente ao que foi feito com as amostras do material vegetal (Figuras 11 e 12). As frações correspondentes ao branco do *pool* 1 proveniente de EP levou à morte das plantas, o que também ocorreu quando testou-se a fração peptídica correspondente a EP *pool* 1 indicando que nesse *pool* há alguma substância, proveniente das etapas de extração/purificação que é tóxica para os tomateiros. Para os outros brancos, não observou-se efeito algum, e o número de plantas com sintomas dos controles foi muito próximo ao número de plantas apenas infectadas com bactéria indicando não existir toxicidade para os tomateiros. Depois de incubadas em câmara de crescimento a 27 °C, as plantas foram avaliadas diariamente quanto à presença ou ausência de murcha bacteriana, principal sintoma da infecção por *R. solanacearum*

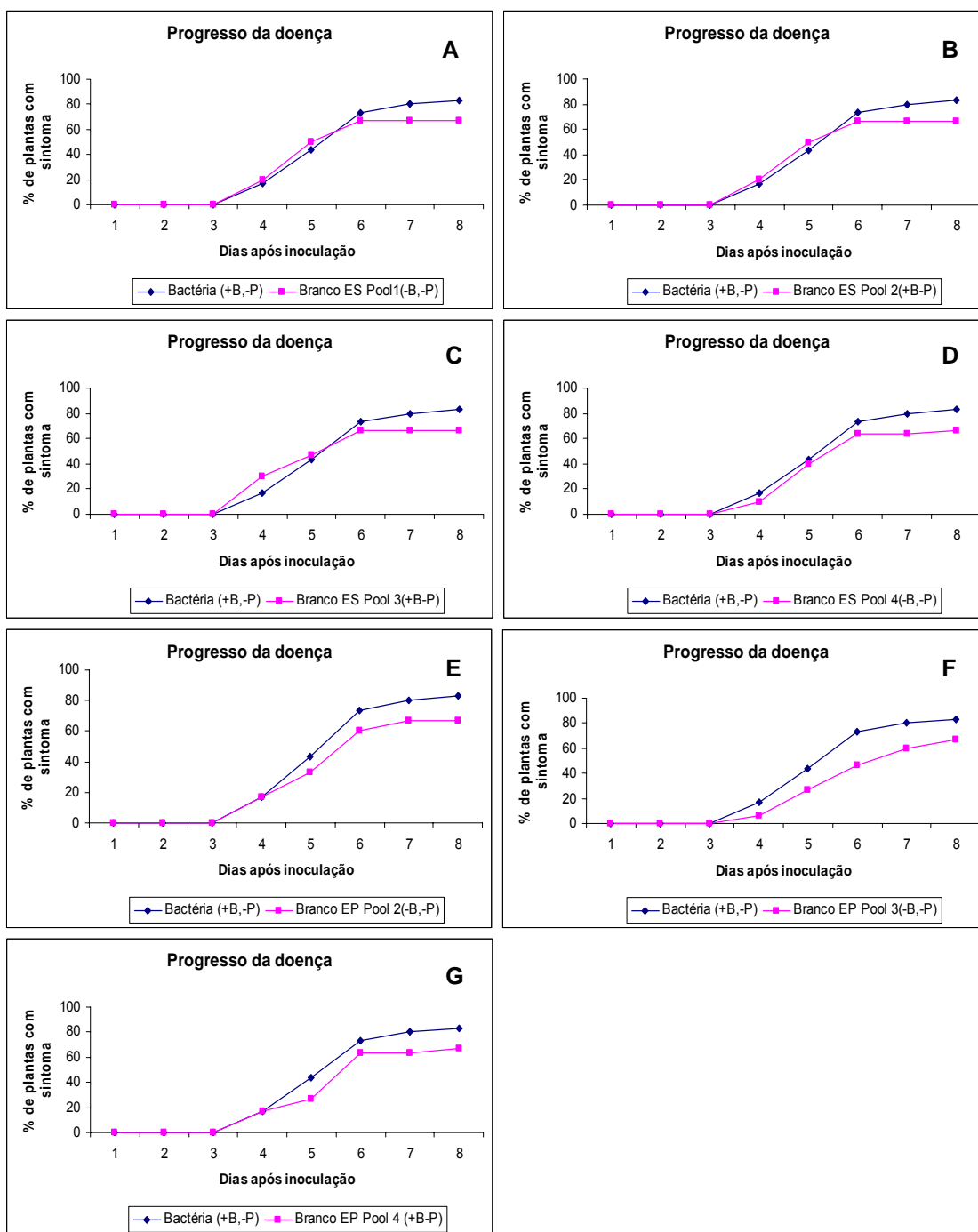


Figura 24 – Curvas de progresso da doença para os brancos de ES e EP após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10, nos quais água substituiu o material vegetal. Esses brancos foram submetidos a todas as etapas de extração e purificação. Foram feitos brancos para os quatro *pool*s de ES: *pool* 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D). O mesmo foi feito para os *pool*s de EP: *pool* 2 (E), 3 (F) e 4 (G). O *pool* 1 proveniente de EP foi tóxico para as plantas, levando-as à morte antes mesmo de haver infecção por *Ralstonia solanacearum*. Nas legendas das Figuras: B, bactéria e P, *pool* ensaiado.

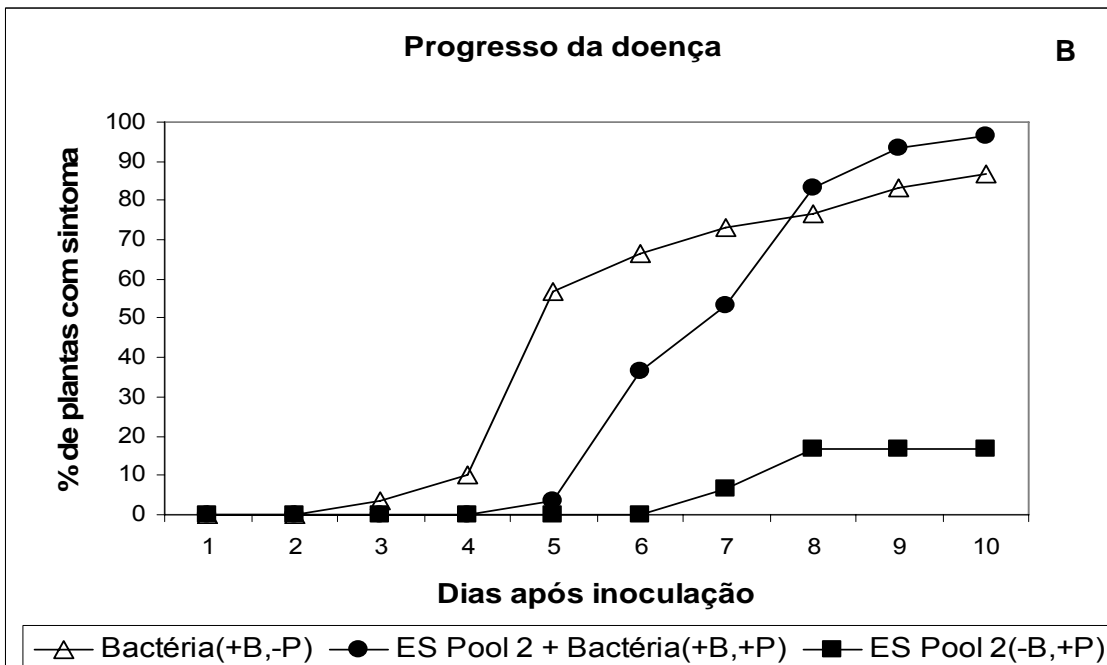
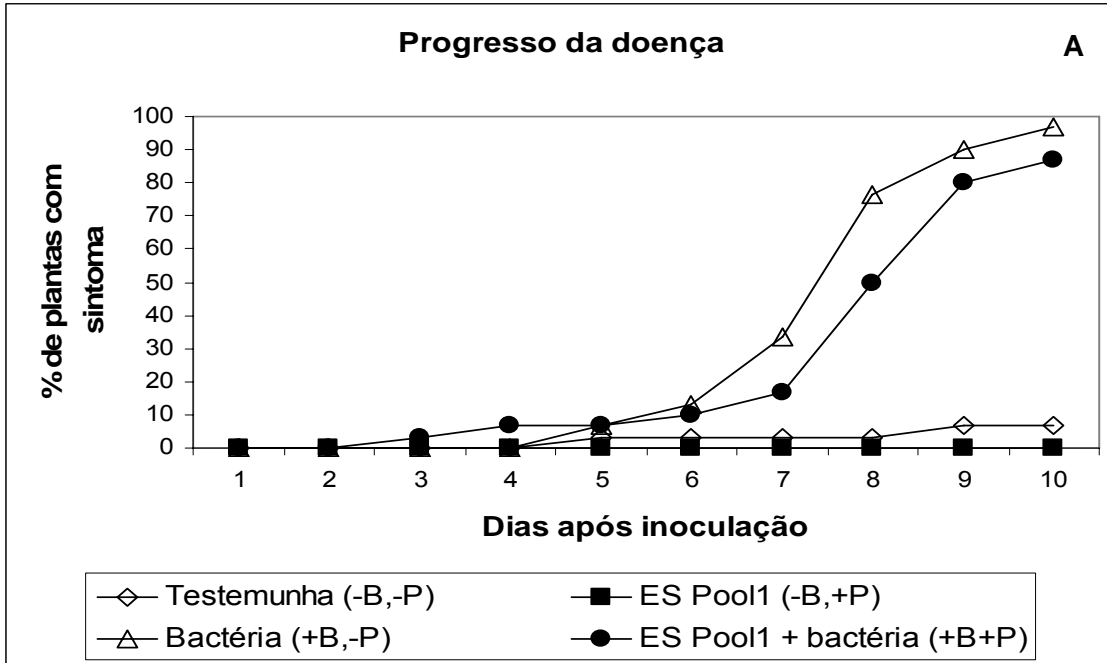


Figura 25 - Curvas de progresso da doença para os *pools* de ES após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10. Foram feitos testes para os quatro *pools* de ES: *pool* 1 (A) e 2 (B) acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por *Ralstonia solanacearum*. Foram feitos controles em que haviam plantas apenas infectadas pela bactéria sem receber nenhum tratamento (+B,-P), plantas tratadas e não infectadas (-B,+P) e plantas não tratadas e não infectadas (-B,-P).

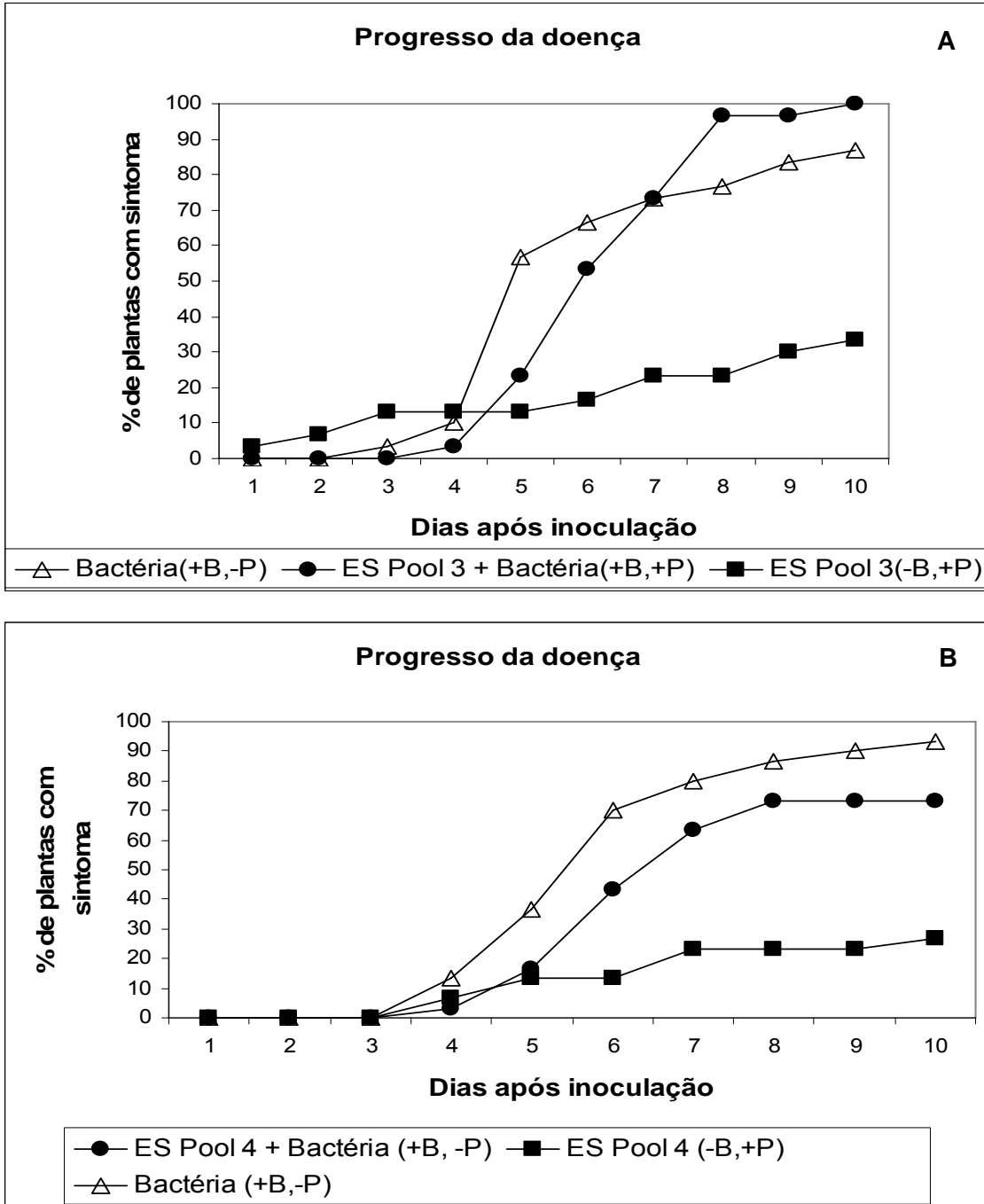


Figura 26 - Curvas de progresso da doença para os *pools* de ES após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10. Foram feitos testes para os quatro *pools* de ES: *pool* 3 (A) e 4 (B) acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por *Ralstonia solanacearum*. Foram feitos controles em que haviam plantas apenas infectadas pela bactéria sem receber nenhum tratamento (+B,-P), plantas tratadas e não infectadas (-B,+P) e plantas não tratadas e não infectadas (-B,-P).

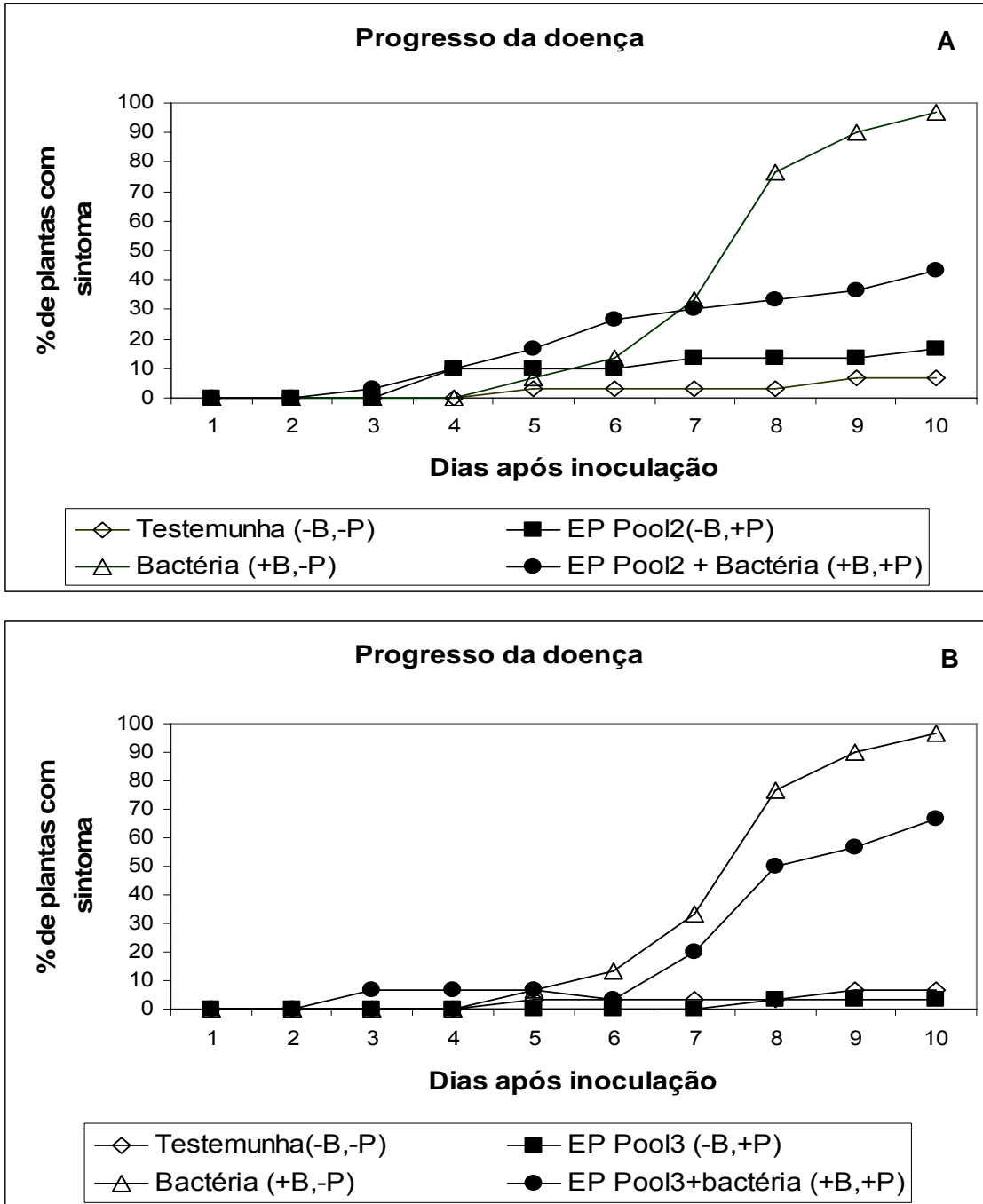


Figura 27 - Curvas de progresso da doença para os *pools* de EP após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10. Foram feitos testes para os *pools* de EP: *pool* 2 (A) e 3 (B) acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por *Ralstonia solanacearum*. Foram feitos controles em que haviam plantas apenas infectadas pela bactéria sem receber nenhum tratamento (+B,-P), plantas que receberam tratamento e não foram infectadas (-B,+P) e plantas que não receberam tratamento e não foram infectadas (B,-P).

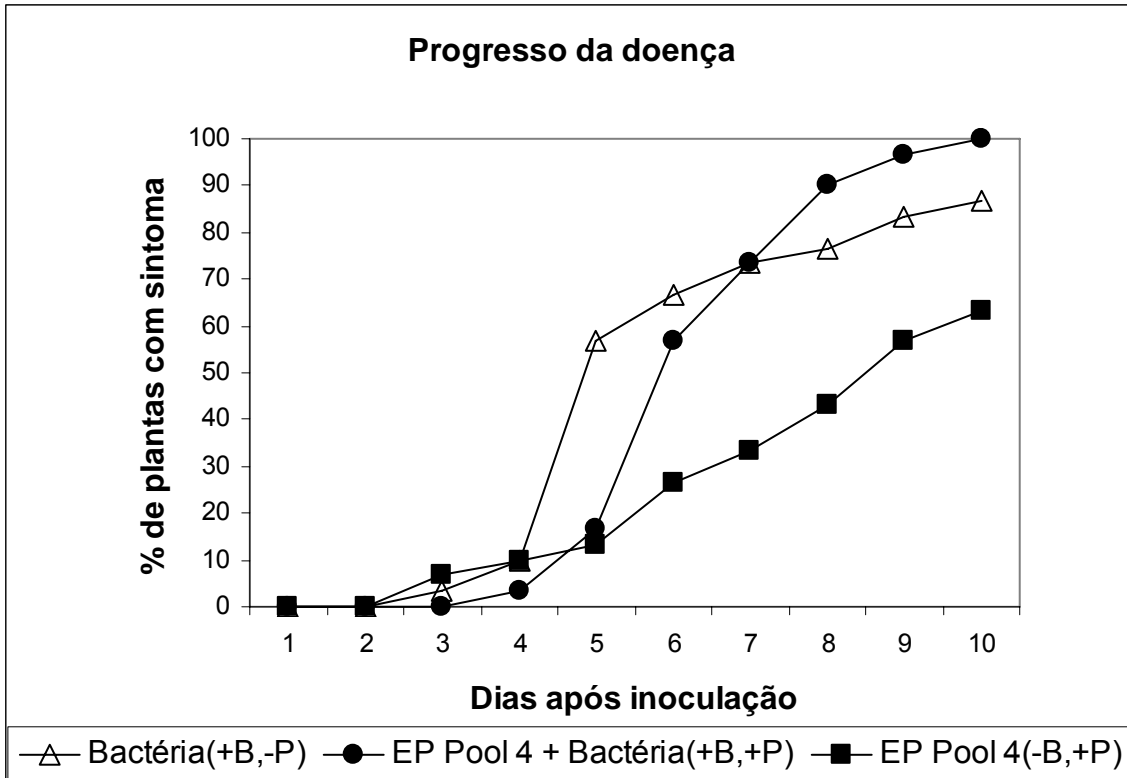


Figura 28 - Curvas de progresso da doença para o *pool* de EP após cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10. Foram feitos testes para o *pool* 4 de EP: acompanhando seu efeito sobre a infecção dos tomateiros por *Ralstonia solanacearum*. Foram feitos controles em que haviam plantas apenas infectadas pela bactéria sem receber nenhum tratamento (+B,-P), plantas que receberam tratamento e não foram infectadas (-B,+P) e plantas que não receberam tratamento e não foram infectadas (-B,-P). O *pool* 1 proveniente de EP foi tóxico para as plantas, levando-as a morte antes mesmo de haver infecção por *R. solanacearum* por isso os dados não estão apresentados.

(Figuras 25, 26, 27 e 28).

Os extratos mostraram diferentes efeitos sobre os tomateiros infectados pela bactéria. Os melhores resultados de inibição pelos extratos aos 10 dias de tratamento foram observados para EP *pool* 2, com 41 % de inibição em relação à testemunha, seguida por EP *pool* 3, com 31 % e ES *pool* 4 com 27 % de inibição. Os *pools* 1, 2 e 3 proveniente de ES, e o *pool* 4 proveniente de EP, aparentemente, retardaram a infecção das plantas.

É possível observar ainda que alguns extratos controlam melhor a infecção em determinado período que outro. Para melhor visualização desses resultados foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC), segundo Campbell e Madden (1990). Foram calculadas as áreas abaixo da curva nos períodos de 5, 7 e 10 dias após a inoculação (Tabela 2). Os resultados estão apresentados em percentagem em relação as curvas para o controle em que as plantas foram infectadas, mas não tratadas com nenhum extrato (+B,-P). Considerou-se que a infecção dos controles foi de 100 % no determinado período observado e foi feita então a relação para as plantas infectadas e tratadas com os extratos.

Os extratos ES *pool 1*, EP *pool 2* e EP *pool 3* aos cinco dias e EP *pool 2* aos dez dias, possuem alguma substância que provoca a murcha dos tomateiros em um número superior ao controle das plantas infectadas e não tratadas.

Tabela 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC), em percentagem, nos períodos de 5, 7, 10 dias após a inoculação, para os *pools* testados. A área do controle em que as plantas foram infectadas por *Ralstonia solanacearum*, mas não foram tratadas (+B,-P) foi considerada como 100 %.

Área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC)			
Extratos testados	Dias após a inoculação		
	0 a 5 dias	0 a 7 dias	0 a 10 dias
ES <i>Pool 1</i>	400,0	95,4	80,7
ES <i>Pool 2</i>	4,0	38,5	77,0
ES <i>Pool 3</i>	4,0	30,8	95,9
ES <i>Pool 4</i>	36,8	59,4	73,2
EP <i>Pool 2</i>	650	195,4	66,4
EP <i>Pool 3</i>	500	100,0	69,6
EP <i>Pool 4</i>	28,0	65,4	93,5

III.3. Conclusões

No experimento de inativação/morte dos fitonematóides, o extrato testado, mostrou um efeito nematicida o que é muito relevante já que o controle dos

fitonematóides é, de modo geral, tarefa de difícil realização e os prejuízos causados na agricultura por esse fitoparasitos, envolvendo queda na produção total e na qualidade do produto colhido.

O experimento feito utilizando tomateiros infectados por *Ralstonia solanacearum* também mostrou resultados relevantes já que alguns extratos como o extrato EP *pool 2*, por exemplo, conferiu às plantas uma alta resistência ao patógeno. Estudos mais detalhados devem ser realizados para o conhecimento da composição de cada produto e o nível de toxicidade a seres humanos e ao meio ambiente.

Conclusões Gerais

O protocolo de extração de peptídeos antimicrobianos de plântulas e de folhas expandidas de berinjela foi ajustado com sucesso. Os resultados obtidos indicam a presença de atividade antimicrobiana nas frações enriquecidas e sugerem que peptídeos ou frações peptídicas de folhas de berinjela apresentam potencial para aplicação como agentes de defesa de plantas.

Embora a literatura relate que folhas maduras sadias não sejam, em geral, boas fontes de peptídeos antimicrobianos constitutivos (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001, Zasloff, 2002), esse trabalho demonstrou, entretanto, que folhas totalmente expandidas de berinjela possuem peptídeos de defesa, com alta atividade antibacteriana, para as duas bactérias testadas, e atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita*. Algumas variedades de solanáceas, como berinjela, pimentão e pimenta, são naturalmente tolerantes a alguns fitopatógenos relevantes, e a expressão dos peptídeos antimicrobianos poderia representar uma defesa pré-existente e constitutiva, e ainda participar de uma resposta induzida por infecção (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001, Morassutti *et al.*, 2002).

Não foi possível observar uma correlação clara entre a concentração do extrato e a inibição do crescimento das bactérias. Entretanto, vale reassaltar que esse extratos são parcialmente purificados, de forma que podem possuir tanto compostos inibidores quanto compostos ativadores do crescimento bacteriano que podem fornecer por exemplo carbono, e assim favorecer o crescimento das bactérias.

Os protocolos de purificação permitiram a separação de peptídeos com atividade antimicrobiana, embora algumas frações necessitem de melhor separação. Os resultados obtidos até o momento indicaram a presença de peptídeos com massas moleculares de 3.703,43 para o pico 18 e 4.139,23 para o pico 24 proveniente de ES PC1 e massas de 5.440,76 Da e 5.463,14 Da, 1.573,48 Da e 1.397 Da para o pico 11; 5.496,90 Da e 4.140,59 Da para o pico 13; 4.389 Da e 3.924 Da; para o pico 15 e 4156,06 e 4.179,21 para o pico 14, provenientes da análise das frações 51 e 53 de ES *pool* 1 obtido da cromatografia em Sephadex G-10. Esses valores de massa molecular estão na região de interesse (2 a 9 kDa).

O mecanismo de defesa por peptídeos apresenta-se vantajoso aos organismos, pois, em função do seu tamanho pequeno, podem ser eficientemente sintetizados de modo rápido, econômico e flexível (Broekaert *et al.*, 1997; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). Além disso, muitos apresentam baixa toxicidade para animais e poucos danos ambientais (Gerhardson, 2002; Knight *et al.*, 1997; Zasloff, 2002). Eles poderiam representar uma nova estratégia no desenvolvimento biotecnológico, neutralizando ou inibindo patógenos sem induzir resistência (Heinemann *et al.*, 2000), por meio da produção de plantas que superexpressam essas moléculas de defesa ou por síntese química das mesmas.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G. N. Plant pathology. 4.ed. *Academic Press*, 635p. 1997.
- Aist, J. R. Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annual Review Phytopathol.* **14**: 145-163, 1976.
- Akiew, E. B.; Trevorrow, P. R. Managemente of bacterial wilt of tobacco. In: Hayward, A. C.; Hartman, G. L. (Ed.) Bacterial wilt: the diseaseand the causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. *CAB International*, 179-198, 1994.
- Alfenas, A. C.; Mafia, R. G.; Sartório, R. C.; Binoti, D. H. B.; Silva, R. R.; Lau, D.; Vanetti, C. A. *Ralstonia solanacearum* em Viveiros Clonais de Eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31(4): 357-366, 2006.
- Almeida, H. O.; Teixeira, F. R.; Romeiro, R. S.; Silva, D. J. H.; Pereira, P. R. G.; Fontes, E. P. B.; Baracat-Pereira, M. C. Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela no controle do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathologica*, 2006, in press.
- Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Zingali, R. B.; Kurtenbach, E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **378 (2)**: 278-286, 2000.
- Almeida, M. S.; Cabral, K. S.; Kurtenbach, E.; Almeida, F. C., Valente, A. V.; Solution structure o *Pisum sativum* defensin1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with diferente mechanisms of action. *Journal Mololecular Biology*, **315**: 749-757, 2002.
- Aumelas, A.; Mangoni, M.; Roumestand, C.; Chiche, L.; Despaux, E.; Grassy, G.; Calas, B.; Chavanieu, A. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *European Journal Biochemistry*, **237**: 575-583, 1996.
- Baermann, G. Eine einfache methode zur auffindung von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Ned. Indie*, **57**: 131-137, 1917.

- Bals, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Resp Res*, **1**:141–50, 2000.
- Bechinger, B., Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**: 1529–1539, 2006.
- Berrocal-Lobo, M.; Segura, A.; Moreno, M.; Lopez, G.; Garcia-Olmedo, F.; Molina, A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology*, **128**: 951–961, 2002.
- Bohlmann, H. The role of thionins in plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **13**: 1-16, 1994.
- Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review Immunology*, **13**: 61-92, 1995.
- Borregaard, N.; Elsbach, P.; Ganz, T.; Garred, P. Innate immunity: from plants to humans. *Immunology Today*, **21**: 68-70, 2000.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A.; Vanderleyden, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, **69**: 55-60, 1990.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A.; Osborn, R. W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, **108**: 1353-1358, 1995.
- Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G. W.; Osborn, R. W. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sc.*, **16**: 297-323, 1997.
- Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev., Microbiol.*, **3**: 238–250, 2005.
- Bruix, M.; Jiménez, M. A.; Santoro, J.; González, C.; Colilla, F. J.; Méndez, E.; Rico, M. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and

- wheat endosperm determined by $^1\text{H-NMR}$: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, **132**: 715-724, 1993.
- Buffy, J. J.; McCormick, W. M. J., S.; Waring, A.; Lehrer, R.I.; Hong, M. Solid-state NMR investigation of the selective perturbation of lipid bilayers by the cyclic antimicrobial peptide RTD-1, *Biochemistry* **43**: 9800–9812, 2004.
- Bulet, P.; Dimarcq, J. L.; Hetru, C.; Lagueux, M.; Charlet, M.; Hegy, G.; Van Dorsselaer, A.; Hoffmann, J. A. A novel inducible antibacterial peptide produced of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *Journal Biology Chemistry*, **268**: 14893-14897, 1993.
- Cammue, B. P. A.; Thevissen, K.; Hendriks, M.; Eggermont, K.; Goderis, I. J.; Proost, P.; Van-Damme, J.; Osborn, R. W.; Guerbette, F.; Kader, J. C. e Broekaert, W. F.. A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology*, **109**: 445 - 455, 1995.
- Campos, V. P. Danos e prejuízos causados por fitonematóides. *Informe Agropecuário*, **16**: 14-15, 1992.
- Chan, D. I.; Prenner, E. J.; Vogel, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1758**: 1184–1202, 2006.
- Chase, A. R.; Jones, J. B. Effects of host nutrition, leaf age, and preinoculation light levels on severity of leaf spot of dwarf schefflera caused by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Disease*, **70**: 561–563, 1986.
- Chitwood, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Services. Pest Manage. *Science*, **59**: 748–753, 2003.
- Christensen B, F. J.; Merrifield R. B.; Mauzerall, D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5072-5076, 1988.

- Cornelissen, B. J. C.; Melchers, L. S.. Strategies for control of fungal disease with transgenic plants. *Plant Physiology*, **101**: 709 - 712, 1993.
- Dave, P.C.; Billington, E.; Pan, Y. L.; Straus, S. K. Interaction of alamethicin with ether-linked phospholipid bilayers: oriented circular dichroism, ³¹P Solid-State NMR, and differential scanning calorimetry studies, *Biophysical Journal*, **89**: 2434–2442, 2005.
- Davis, M. J.; Gillaspie Jr., A. G.; Vidaver, A. K.; Harris, R. W. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. Nov., subsp., nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis* subsp. Nov., pathogens that cause rato stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Journal of System Bacteriology*, **34**: 107 - 117, 1984.
- Dropkin, V. H. The necrotic reaction of tomatoes and other host resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*, **59**: 1632-1639. 1969.
- Duvick J. P.; Rood, T.; Rao, A. G.; Marshak, D. R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays*L.) kernels. *Journal Biology Chemistry*, **267**:18814–18820, 1992.
- Epple, P.; Apel, K.; Bohlmann, H. *Plant Cell*, **9**: 509-520, 1997.
- Ferris, H.; Zheng, L. Plant sources of chinese herbal remedies: effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, **31 (3)**: 241-263, 1999.
- Ferreira, L. P; Salgado, C. L. Bactérias. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos, **1**: 197-130, 1995.
- Finken, M.; Kirschner, P.; Meier, A.; Wrede, A.; Böttger, E. C. Molecular basis of streptomycin resistance in mycobacterium-tuberculosis - Alterations of the ribosomal-protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal-RNA pseudoknot, *Molecular Microbiology*, **9**: 1239–1246, 1993.
- Freitas, L.G.; Oliveira, R.D.L.; Ferraz, S. **Introdução à nematologia**. Cadernos didáticos N° 58. Viçosa: Editora UFV. 84p. 2001.

- Ganz, T.; Lehrer, R.I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, **5**: 292-297, 1999.
- García-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; Rodríguez-Palenzuela, P. Plant defense peptides. *Biopolymers*, **47**: 479-491, 1998.
- García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M. e Poza-Carrión, C. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Letters*, **498**: 219 - 222, 2001.
- Gatermann, K. H.; Kirchner, J. E.; Grafen, I.; Eichenlaub, R. e Burgere, A.. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, **106**: 179 - 191, 2003.
- Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, Londres, 20 (**8**): 338 - 343, 2002.
- Ghini, R.; Kimati, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, SP: *Embrapa Meio Ambiente*, 2000.
- Giacometti, A.; Cirioni, O.; Kamysz, W.; D'Amato, G.; Silvestri, C.; Licci, A.; Nadolski, P.; Riva, A.; Lukasiak, J.; Scalise, G. In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**: 235–240, 2005.
- Goransson, U.; Luijendijk, T.; Johansson, S.; Bohlin, L.; Claeson, P. Seven novel macrocyclic polypeptides from *Viola arevensis*. *Journal Nat Prod*; **62**: 283–286, 1999.
- Goto, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. *Academic Press*, 342p., 1992.
- Graham, T. L.; Graham, M. Y. Signaling in soybean phenylpropanoid responses (Dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments). *Plant Physiology*, **110**: 1123–33, 1996

- Hancock, R. E. W.; Rezek, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, **206**: 143 - 149, 2002.
- Hancock, R. E. W.; Chapple, D. S. Peptides antibiotics. *Antimicrobial Agents Chemother*, **43**: 1317 - 1323, 1999.
- Hancock, R. E. W.; Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *TRENDS in Microbiology*, **8**: 402-410, 2000.
- Hancock, R. E. W.; Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, **16**: 82-88, 1998.
- Hancock, R. E. W.. Concerns regarding resistance to self-proteins. *Microbiology*, **149**: 3343 - 3344, 2003.
- Hancock R. E. W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *Lancet Infect. Disease*, **1**: 156–164, 2001.
- Hancock, R. E. W., Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens, *Lancet Infect. Disease*, **5**: 209–218, 2005.
- Hallock, K. J.; Lee, D. K.; Omnaas, J.; Mosberg, H. I.; Ramamoorthy, A. Membrane composition determines pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption, *Biophysical Journal*, **83**: 1004–1013, 2002.
- Harbone, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. H. B. Jovanosvish, *Academic Press Inc.*, London, 1982.
- Hayward, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, **27**: 65-87, 1991.
- Hayward, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A. C.; Hartman, G. L. (Ed.). Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. *CAB International*, 9-24, 1994.

- Heinemann, J. A.; Ankenbauer, R. G.; Amibile-Cuevas, C. F. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *DDT*, **5**:195 - 204, 2000.
- Holtorf, S.; Ludwig-Muller, J.; Apel, K.; Bohlmann, H. *Plant Molecular Biology*, **36**: 673-680, 1998.
- Hoover, D. M.; Rajashankar, K. R.; Blumenthal, R.; Puri, A.; Oppenheim, J. J.; Chertov, O.; Lubkowski, J. The structure of human β -defensins-2 shows evidence of higher order oligomerization. *Journal Biology Chemistry*, **275**: 32911- 32918, 2000.
- Hoover, D. M.; Chertov, O.; Lubkowski, J. The structure of human β -defensins-1. New insights into structural properties of β -defensins. *Journal Biology Chemistry*, **276**: 39021- 39026, 2001
- Hultmark, D. Drosophila immunity: paths and patterns. *Current Opinion Immunology*, **15**: 12–19, 2003.
- Hussey, R. S. Host-parasite relationship and associated physiological changes. In: J.N. SASSER & C. C. CARTER, eds. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Vol. I: Biology and control. North Carolina State University Graphics. Raleigh, p.143-153. 1985.
- Hussey, R. S., Barker, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* **57**: 1025-1028, 1973.
- Jahr, H.; Bahro, R.; Burger, A.; Ahlemeyer, J.; Eichenlaub, R. Interaction between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology*, **1(2)**: 113 - 118, 1999.
- Judd, R. C., Electrophoresis of peptides. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 32: *Basic Protein and Peptide Protocols*, Ed. J. M. Walker Copyright, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 49-57, 1994.
- Kelman, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, **44**: 693-695. 1954.

- Khan, Z.; Kim, Y. H.; Kim, S. G.; Kim H. W. Observations on the suppression of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) on tomato by incorporation of cyanobacterial powder (*Oscillatoria chlorina*) into potting Weld soil. *Bioresource Technology*, **98**: 69–73, 2007.
- Kiewnick, S.; Sikora, R. A. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control*, **38**: 179–187, 2006.
- Kim, H. S. *et al.* Pepsin mediated processing of the cytoplasmic histone 2A to the strong antimicrobial peptide Buforin I. *Journal Immunology*, **165**: 3268-3274, 2000.
- Knight, S. C.; Anthony, V. M.; Brady, A. M.; Greenland, A. J.; Heaney, S. P.; Murray, D. C.; Powell, K. A.; Schulz, M. A.; Spinks, C. A.; Worthington, P. A.; Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review Phytopathology*, **35**: 349-372, 1997.
- Lazzeri, L.; Tacconi, R.; Palmieri, S. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. *Journal Agric. Food Chemical*, **41**:825-829, 1993.
- Lewis, J. A.; Papavizas, G. C. Effect of sulfur-containing volatile compounds and vapors from cabbage decomposition on *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, **61**: 208-214, 1971.
- Liang, J. F.; Kim, S. C. J. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. *Peptide Resource*, **53**: 518-522, 1999.
- Linthorst H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Review Plant Science*, **10**: 123–150, 1991.
- Lohner, K. The role of membrane lipid composition in cells targeting of antimicrobial peptides. In “Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Lohner, K. (Ed), *Horizon Scientific Press*, England, p. 149-165, 2001.
- Lopes, C. A.; Reifschneider, F. J. B. Manejo integrado das doenças da batata. *Informe Agropecuário*, **20**: 56-60, 1999.

- López-Solanilla, E.; García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P. *Plant Cell*, **10**: 917-924, 1998.
- Mansfield J. W. Antimicrobial compounds and resistance. The role of phytoalexins and phytoanticipins. In: Slusarenko A, Fraser RSS, van Loon LC, editors. Mechanisms of resistance to plant diseases. Dordrecht: Kluwer; p. 325–70, 2000.
- Marr, A. K.; Gooderham, W. J.; Hancock, R. E. W. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in Pharmacology*, **6**: 468-472, 2006.
- Mayton, H. S.; Claudia, O.; Vaughn, S. F.; Loria, R. Correlation of fungicidal activity of Brassica species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology*, **86**: 267-271, 1996.
- Moreno, M.; Segura, A.; Garcia-Olmedo, F. Pseudothionin, a potato peptide active against potato pathogens. *European Journal Biochemistry*, **223**: 135-139, 1994.
- Morassutti, C; De Amicis, F.; Skerlavaj, B; Zanetti, M e Marchetti, S.. Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Letters* **519**: 141 - 146, 2002.
- Motoyama, M. M., Estrada, K. R. F. S., Stangarlin, J. R., Fiori, A. C. G., Scapim, C. A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. Acta Scientiarum. Agronomy, 25, **(2)**: 509-512, 2003
- Mourgues, F.; Brisset, M-N; Chevreau, E. Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotechnol.*, **16**: 203 - 210, 1998.
- Muñoz, A.; López-García, B.; Marcos, J. F. Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **354**: 172-177, 2007.
- Nakano, Y.; Suzuki, N.; Yoshida, Y.; Nezu, T.; Yamashita, Y. e Koga, T.. Thymidine diphosphate-6-deoxy-L-lyxo-4-hexulose reductase synthesizing dTDP-6-deoxy-L-

- talose from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (10): 6806 - 6812, 2000.
- Nakasone, A.K. *et al.* Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatógenos. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, 25 (4): p.331, 1999.
- Nico, A. I.; Jime´nez-Dí´az, R. M.; Castillo, P. Control of rootknot nematodes by agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Prot.*, 23: 581–587, 2004.
- Noling, J. W., Becker, J.O.. The challenge of research and extension and implement alternatives to methyl bromide. *Journal of Nematology*, 26: 573–586, 1994.
- Oerke, E. C. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31–43, 2006
- Oka, Y.; Koltai, H.; Bar-Eyal, M.; Mor, M.; Sharon, E.; Chet, I.; Spiegel, Y. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science*, 56: 983–988, 2000.
- Osborn, R. W.; De Samblanx, G. W.; Thevissen, K.; Goderis, I.; Torrekens, S.; Leuven, F. V.; Attenborough, S.; Rees, S. B. ; Broekaert, W. F. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters*, 368: 257-262, 1995.
- Ostberg, J. E.; Attar, M. J.; Mohamed-Ali, V.; Conway, G. S. Adipokine dysregulation in turner syndrome: comparison of circulating interleukin-6 and leptin concentrations with measures of adiposity and C-reactive protein. *Journal Clinic Endocrinology. Metab.*, 90, 5: 2948 - 2953, 2005.
- Panter S. N., Jones, D. A. Age-related resistance to plant pathogens. *Adv Bot Res Incorporating Adv Plant Pathology*, 38: 251–280, 2002.
- Papagianni, M. Ribossomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications, *Biotechnol Adv.*, 21: 465-499, 2003.
- Papo, N.; Shai, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides*, 24: 1693-1703, 2003.

- Park, C. J.; Park, C. B.; Hong, S. S.; Lee, H. S.; Lee, S. Y.; Kim, C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Molecular Biology*, **44**:187–97, 2000.
- Patton, W. F. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B.*, **771**: 3–31, 2002.
- Porcelli Buck, F. B.; Lee, D. K.; Hallock, K. J.; Ramamoorthy, A.; Veglia G. Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes, *Journal Biology Chemistry*, **279**: 45815–45823, 2004.
- Powers, J. P.; Hancock, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides*, **24**: 1681–1691, 2003.
- Pretorius, Z. A.; Rijkenberg, F. H. J.; Wilcoxson, R. D. Effects of growth stage, leaf position, and temperature on adult-plant resistance of wheat infected by *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. *Plant Pathology*, **37**: 36–44, 1988.
- Quarles, W. Botanical pesticides from *Chenopodium*. *IPM Practitioner*, **14 (2)**: 1-11. 1992.
- Rao, A. G. Antimicrobial peptides. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, Londres, **1**: 06 - 13, 1998.
- Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24**: 536–547, 2004.
- Romeiro, R. S.; Neto, J. R., Diagnose de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. Cadernos Didáticos, Editora UFV nº **78**: 13-16, 2001
- Rommens, C. M.; Kishore, G. M. Exploiting the full potential of disease resistance genes for agricultural use. *Current Opinion Biotechnology*, **11**: 120-125, 2000.
- Rupe, J. C.; Gbur Jr, E. E. Effects of plant age, maturity group, and environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, **79**:139–43, 1995.

- Rozek, A.; Friedrich, C. L.; Hancock, R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, **39**: 15765-15774, 2000.
- Sasser, J. N.; Freckman, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: J. A. VEECH & D. W. DICKSON, (Ed.) *Vistas on Nematology*. Maryland: Society of Nematologists, p. 7-14, 1987.
- Sawai, M. V.; Jia, H. P.; Liu, L.; Aseyev, V.; Wiencek, J.M.; McCray, B.P.Jr.; Ganz, T.; Kearney, W.R.; Track B.F. The NMR structure of human β -defensins-2 reveals a novel alpha-hekicak segment. *Biochemistry*, **40**: 3810- 3816, 2001.
- Schagger, H.; von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochemistry*, **166**: 368-79, 1987.
- Segura, A.; Moreno, M.; Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*) *FEBS Letters*, **435**:159-162, 1998.
- Shinnar, A. E. *et al.* in *Peptides: Chemistry and Biology*. Proc. 14 th Am. Peptide Symp. (eds.Kaumaya, P.; Hodges, R. J. 189-191 (Mayflower Scientific, Leiden, 1996)
- Simmaco, M.; Mignogna, G.; Barra, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers*, **47**: 435-450, 1998.
- Stackebrandt, E.; Rainey, F. A.; Wardrainey, N. L..Proposal for a new hierarchic classification system. *Actinobacteria classis nov.* *Int. Journal of System Bacteriology*, **47**: 479 - 491, 1997.
- Stangarlin, J. R. *et al.* *Plantas Mediciniais. Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 2 (**11**): 16-24. 1999.
- Straus, S. K.; Hancock, R. E.W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**: 1215–1223, 2006.

- Strider, D. L. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganensis*: a literature review and bibliography. N. C. Agric. Exp. Stn. *Tech. Bull.* 193, 1969.
- Syed, A. R.; Loke, W. H. Development and challenges in pest management of vegetables. Malasia Plant Protection Society, p. 43 - 56, 1995.
- Takatsu, A.; Lopes, C. A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira*, **15**: 170-177, 1997.
- Tang, Y. Q.; Yuan, J.; Osapay, G.; Osapay, K.; Tran, D. and Miller, C.J.; Ouellette, A.J. and Selsted, M.E. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensin. *Science*, **286**: 498-502, 1999.
- Taylor, C. B.; Acland, D. P.; Attenborough, S.; Cammue, B. P. A., Evans, I. J.; Osborn, R. W.; Rees, S. B.; Broekaert, W. F. A novel family of small cyteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *Journal Biology Chemistry*, **272**: 24480-24487, 1997.
- Taylor, C. B. Defense responses in plants and animals – more of the same. *Plant Cell*, **10**: 873-874, 1998.
- Teixeira, FR Lima, MCO, Almeida, HO, Romeiro, RS, Silva, DJH, Pereira, PRG, Fontes, EPB, Baracat-Pereira, MC. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *Journal of Phytopathology*, **154**: 418–421, 2006.
- Tejada, G. M.; Pizzaro-Cerda, J.; Moreno, E. and Moriyon, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection Immunology*, **63**: 3054-3061, 1995.
- Terras, F. R. G.; Schoofs, H. M. E.; De Bolle, M. F. C.; Leuven, F. V.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A.; Broekaert, W. F. Analysis os two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal Biology Chemistry*, **267**: 15301-15309, 1992.

- Terras, F. R. G.; Torrekens, S.; Leuven, F. V.; Osborn, R. W.; Vanderleyden, J.; Cammue, P. A.; Broekaert, W. F. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal protein from Brassicaceae species. *FEBS Letters*, **316**: 233-240, 1993.
- Terras, F. R. G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N. V.; Osborn, R. W.; Kester, A.; Rees, S. B.; Torrekens, S.; Leuven, F. V.; Vanderleyden, J.; Cammue, P. A.; Broekaert, W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, **7**: 573-588, 1995.
- Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn, R. W.; Broekaert, W. F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *Journal Biology Chemistry*, **271**: 15018-15025, 1996.
- Thevissen, K.; Cammue, B. P. A.; Lemaire, K.; Winderickx, J.; Dickson, R. C.; Lester, R. L.; Ferket, K. K. A.; Even, F. V.; Parret, A. H. A.; Broekaert, W. F. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *PNAS.*, **15**: 9531-9536, 2000.
- Thevissen, K.; Baldys J. I.; Im Y. J.; Takemoto J; François, I. E. J. A; Ferket, K. K. A.; Aerts, A. M.; Meerta, E. M. K.; Winderickxc, J.; Roosenc ,J.; Cammue, B.P.A. SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. *FEBS Letters*, **579**: 1973–1977, 2005
- Thomma, B. P. H. J.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K . Plant defensins. *Planta*, **216**: 193-202, 2002.
- Thuerig, B.; Felix, G.; Binder, A.; Boller, T.; Tamm, L. An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1–14, 2006.
- Titarenko, E.; López-Solanilla, E.; García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P. *Journal Bacteriology*, **179**: 6699-6704, 1997.
- Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **55**: 4–30, 2000.

- Ulvatne, H.; Vorland, L. H. Bactericidal kinetics of three lactoferricins against *S. aureus* and *E. coli*. *Scand. Journal Infect. Disease*, **33**: 507-511, 2001.
- Wu, M. E.; Maier, Benz, R.; Hancock, R. E. W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **38**: 7235–7242, 1999.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**: 389-395, 2002.
- Zeier, J. Age-dependent variations of local and systemic defence responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **66**: 30–39, 2005.
- Zeier, J.; Pink, B.; Mueller, M. J.; Berger, S. Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant–pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta*, **219**: 673–83, 2004.
- Zuckerman, B. M.; Esnard, J. Biological control of plant nematodes current status and hypothesis. *Jpn. Journal Nematology*, **24**: 1–13, 1994.

ANEXOS

Anexo 1

Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Hebréia de Oliveira Almeida¹, Felipe Roberti Teixeira¹, Reginaldo da Silva Romeiro², Derly José Henriques da Silva³, Paulo Roberto Gomes Pereira³, Elizabeth Pacheco Batista Fontes¹, Maria Cristina Baracat-Pereira^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOAGRO, ²Departamento de Fitopatologia, ³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36.570-000, Viçosa-MG, Brasil.

*Autor para correspondência. baracat@ufv.br

Data de chegada: __/__/____. Aceito para publicação em: __/__/____.

ABSTRACT

Almeida, H.O.; Teixeira, F.R.; Romeiro, R.S.; Silva, D.J.H.; Pereira, P.R.G.; Fontes, E.P.B.; Baracat-Pereira, M.C. Antimicrobial activity of peptide extracts of eggplant leaves in the inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* growth. *Summa Phytopathologica*, v. __, n. __, p. __-__, 200__.

Natural compounds, such as antimicrobial peptides, have been potentially considered as sources of defense agents against commercially relevant phytopathogens. This work aimed to obtain peptide-enriched fractions from eggplant leaf protein extracts in order to evaluate their antimicrobial activities against two phytopathogenic bacteria. The resulting cationic pools, PC1 and PC2, and the anionic PA pool from leaf soluble (ES) and cell wall (EP) extracts were analyzed in two concentrations. For ES and EP, growth inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis was higher than 60%, being PC2-2X (higher evaluated concentration) fraction the most effective. These results suggest that eggplant leaf extracts contain peptides with potential use as plant defense agents.

Additional Keywords: Antimicrobial peptide, solanaceous, plant defense.

RESUMO

Almeida, H.O.; Teixeira, F.R.; Romeiro, R.S.; Silva, D.J.H.; Pereira, P.R.G.; Fontes, E.P.B.; Baracat-Pereira, M.C. Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathologica*, v. __, n. __, p. __-__, 200__.

Compostos naturais, incluindo-se peptídios antimicrobianos, vêm se destacando como fontes de agentes de defesa contra fitopatógenos de importância comercial. Esse trabalho visou obter frações peptídicas a partir de extratos de folhas de berinjela e avaliar as atividades antimicrobianas contra duas bactérias fitopatogênicas. Os pools peptídicos catiônicos, PC1 e PC2 e o aniônico PA obtidos de extratos solúvel (ES) e de parede celular (EP) foram analisados em duas concentrações. Para ES e EP, obteve-se inibição do crescimento da *Ralstonia solanacearum* e da *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* superior a 60%, sendo PC2-2X (maior concentração avaliada) a mais efetiva. Os resultados sugerem que extratos de folhas de berinjela apresentam peptídios com potencial aplicação como agentes de defesa de plantas.

Palavras-chave adicionais: Peptídio antimicrobiano, solanáceas, defesa de plantas.

INTRODUÇÃO

Os peptídios antimicrobianos (AMPs) são importantes componentes da defesa inata de plantas e de outros organismos, e sua ação corresponde a uma estratégia de defesa antiga, econômica e com amplo espectro de ação antimicrobiana (2, 5). No

agronegócio, pesquisas visam obter novos defensivos agrícolas contendo tais compostos (7), já que podem apresentar atividades contra bactérias, fungos, vírus e/ou protozoários e atuam em baixas concentrações com baixa toxicidade e baixo impacto ambiental (2). Os AMPs poderiam contribuir para o controle da murcha e do cancro bacterianos (3, 4). O presente trabalho visou avaliar frações peptídicas de extratos solúvel (ES) e de parede celular (EP) de folhas de berinjela quanto à atividade contra fitopatógenos, e identificar princípios ativos para a produção de defensivos agrícolas naturais para uso comercial.

Plantas de berinjela (*Solanum melongena*, var. Florida Market, Dpto. Fitotecnia, UFV) foram cultivadas em sistema hidropônico e as folhas totalmente expandidas (18 g) foram coletadas e maceradas (1:4, p:v) com Tris-HCl 100 mM pH 7, EDTA, PMSF, benzamidina e tiouréia (9). Após centrifugação, o sobrenadante foi reservado, o precipitado lavado (água, 3 vezes), centrifugado, e os sobrenadantes misturados com o reservado anteriormente, sendo a amostra denominada extrato solúvel bruto (ESB). O precipitado foi ressuspenso em LiCl 1,5 M (1:2,5, p:v), EDTA, PMSF, benzamidina e tiouréia. O homogenato foi agitado, centrifugado e o sobrenadante denominado extrato de parede celular bruto (EPB). As centrifugações foram a 20.300 g por 30 min a 4°C.

ESB e EPB foram separadamente fracionados com sulfato de amônio (35% sat.), centrifugados, aquecidos (80°C, 15 min) e centrifugados. Os sobrenadantes ES e EP, respectivamente, foram dialisados (1.000 Da) e cromatografados por troca aniônica (CTA) (DEAE-Sepharose, GE), em equipamento FPLC (BioRad). A coluna (15 mL) foi equilibrada em Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e as amostras fracionadas a 1,0 mL/min, na solução de equilíbrio, na ausência (obter a fração catiônica) e na presença (obter a fração aniônica) de NaCl 1 M. Dois *pools* catiônicos (PC1 e PC2) e um aniônico (PA) foram obtidos, dialisados e concentrados a 270 µL. Parte de cada pool (89%) foi

utilizada para testes antimicrobianos em microplacas e parte (11%) para a separação por SDS-Tricina-PAGE, em mini-gel de três fases (6). As bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Depto. Fitopatologia, UFV) foram cultivadas em meio LB líquido, a 28 °C. Os testes foram desenvolvidos em duplicata e em duas concentrações (1X e 2X, 7,4% e 14,8%, respectivamente) de PC1, PC2 ou PA.

Frações parcialmente purificadas de ES e EP apresentaram bandas peptídicas (Figura 1) e atividade antimicrobiana (Tabela 1). Nossos resultados mostraram que folhas totalmente expandidas de berinjela possuem peptídios constitutivos com alta atividade antimicrobiana, ao contrário do sugerido por Broekaert et al. (1), que relataram que folhas maduras sadias, em geral, não são boas fontes desses compostos.

PC1-2X, PC1-1X e PA-1X, originadas de ES, inibiram o crescimento de *R. solanacearum* acima de 85%, enquanto que PC2-1X; PC2-2X e PA-2X promoveram inibição total (Tabela 1). As mesmas amostras promoveram inibições superiores a 60% para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Tabela 1). A maior inibição foi observada nas maiores concentrações de PC2 e PA, tanto para amostras de ES quanto de EP, indicando que a inibição foi dependente da concentração dos componentes da mistura, característica comum a agentes de defesa comerciais (7). Sugere-se que esses extratos têm potencial para a bioprospecção de agentes de defesa naturais, sendo PC2 a fração mais promissora. Os resultados evidenciaram ainda que PA (de ES ou EP) apresentou atividade antimicrobiana (Tabela 1), porém bandas peptídicas não foram observadas em gel (Figura 1). Peptídios aniônicos podem ser membros da defesa inata de plantas (8).

O perfil eletroforético de PC1, PC2 e PA de ES e EP indicou que a metodologia de enriquecimento dessas moléculas foi satisfatória, e permitiu a visualização de bandas peptídicas (Figura 1). No geral, os AMPs estão presentes em baixas concentrações nos

tecidos vegetais (1, 2). Ainda assim, foi possível observar bandas peptídicas em PC2 de ES e de EP (Figura 1), que são os *pools* com as maiores atividades antimicrobianas.

Algumas frações inibiram totalmente as culturas das duas bactérias analisadas, uma Gram-positiva e outra Gram-positiva, o que é relevante frente ao objetivo de se encontrar AMPs com amplo espectro de ação antimicrobiana, que atuem como moléculas-modelo para desenvolver produtos de defesa naturais. A alta atividade inibitória observada para *R. solanacearum* é de grande valia pois apenas quatro das dez classes descritas de AMPs de plantas inibem bactérias Gram-negativas (4).

Algumas variedades das solanáceas berinjela, pimentão e pimenta são mais resistentes a *Ralstonia solanacearum*. A expressão dos AMPs poderia explicar esse fato, por meio de uma defesa pré-existente e constitutiva, ou ainda de uma resposta induzida (2). Como vantagem dessa forma de defesa, observa-se que os AMPs, em função do seu tamanho pequeno, podem ser eficientemente sintetizados de modo rápido e econômico (1, 2) e poderiam representar uma nova estratégia na identificação de princípios ativos para o desenvolvimento de novas classes de defensivos para a agroindústria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G.; Cammue, B.P.A.; Osborn, R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant Physiology**, Sofia, v.108, n.4, p.1353-1358, 1995.
2. García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M.; Poza-Carrión, C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. **FEBS Letters**, London, v.498, n.2/3, p.219-222, 2001.

3. Lopes, C.A.; Santos, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1994. 61p.
4. Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, London, v.20, n.8, p. 338-343, 2002.
5. Giacometti, A.; Cirioni, O.; Kamysz, W.; Silvestri, C.; Licci, A.; Riva, A.; Lukasiak, J.; Scalise, G. In vitro activity of amphibian peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. **Peptides**, London, v.20, n.11, p.2111-2116, 2005.
6. Judd, R.C. Electrophoresis of peptides. In: Walker, J.M. (Ed.). **Methods in molecular biology: basic protein and peptide protocols**. Totowa: Humana Press, 1994. chap. 32, p. 49-57.
7. Knight, S.C.; Anthony, V.M.; Brady, A.M.; Greenland, A.J.; Heaney, S.P.; Murray, D.C.; Powell, K.A.; Schulz, M.A.; Worthington, P.A.; Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n.1, p.349-372, 1997.
8. Lai, R.; Lui, H.; Lee, W.H.; Zhang, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v.295, n.4, p.796-799, 2002.
9. Teixeira, F.R.; Lima, M.C.O.P.; Almeida, H.O.; Romeiro, R.S.; Silva, D.J.H.; Pereira, P.R.G.; Fontes, E.P.B.; Baracat-Pereira, M.C. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v.154, p.418-421, 2006.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem às agências FAPEMIG e CNPq.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de extratos (ES e EP) de folhas de berinjela totalmente expandidas, após fracionamento por cromatografia de troca iônica.

Extrato	Fração parcialmente purificada	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
		Porcentagem média de inibição* ± DP	
Extrato Solúvel (ES)	Controle da cultura	0,0 ± 0.034	0,0 ± 0.000
	Controle do meio	100,0 ± 0.010	100,0 ± 0.025
	PC1-1X	90,5 ± 0,004	76,8 ± 0,008
	PC1-2X	85,3 ± 0,000	59,8 ± 0,003
	PC2-1X	100,0 ± 0,003	81,0 ± 0,001
	PC2-2X	100,0 ± 0,001	96,5 ± 0,003
	PA-1X	92,9 ± 0,000	80,4 ± 0,001
	PA-2X	100,0 ± 0,005	93,9 ± 0,011
Extrato de Parede Celular (EP)	Controle da cultura	0,0 ± 0.034	0,0 ± 0.000
	Controle do meio	100,0 ± 0.010	100,0 ± 0.025
	PC1-1X	0,0 ± 0,001	37,9 ± 0,013
	PC1-2X	29,5 ± 0,029	26,0 ± 0,017
	PC2-1X	10,4 ± 0,019	73,3 ± 0,006
	PC2-2X	88,5 ± 0,006	100,0 ± 0,010
	PA-1X	64,6 ± 0,006	59,5 ± 0,005
	PA-2X	82,0 ± 0,018	65,9 ± 0,008

* Os testes foram desenvolvidos em microplacas com capacidade para 96 amostras, avaliando-se os valores de absorvância a 560 nm (A_{560}) após 21 h de cultivo. Para cada ensaio, foram adicionados 50 µL de meio LB concentrado duas vezes (2X), 10 µL da suspensão bacteriana ($A_{560} = 1,0-1,2$) e 40 µL da fração peptídica a ser testada (amostras) ou de água ultrapura (controle da cultura). O controle do meio de cultivo consistiu de 50 µL de meio LB 2X e 50 µL de água ultrapura.

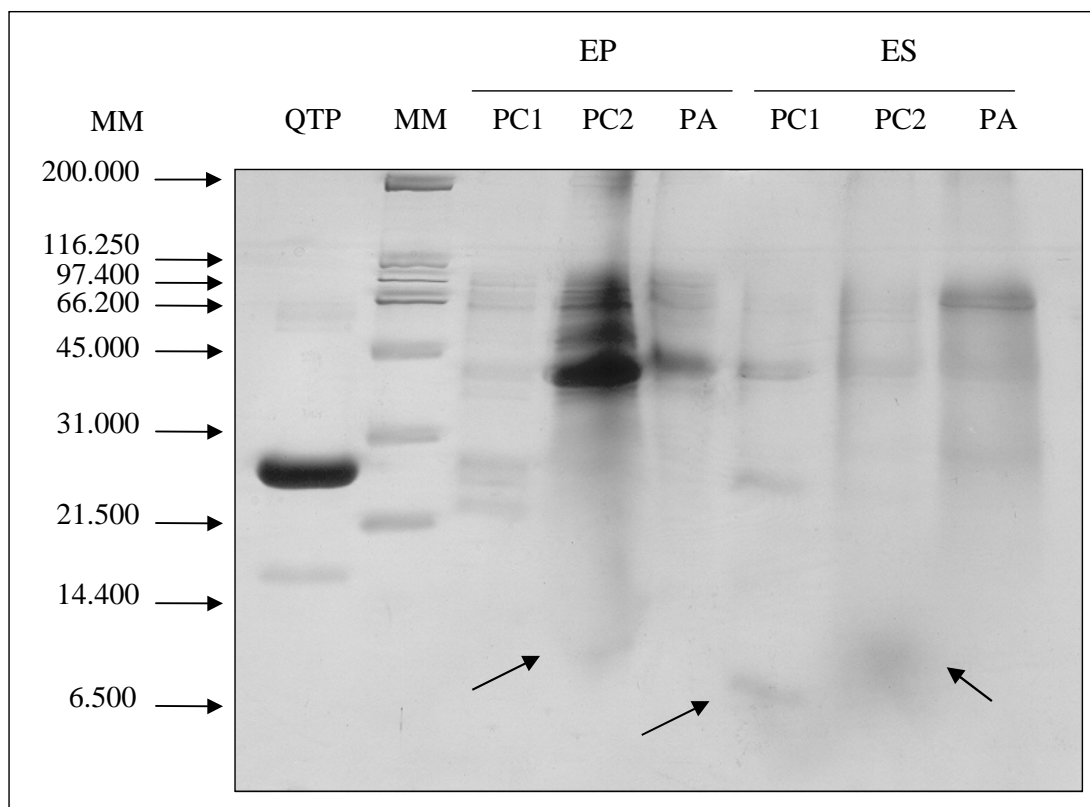


Figura 1. – Eletroforese em gel desnaturante de três fases, em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE), dos *pools* catiônicos (PC1 e PC2) e aniônico (PA) dos extratos de parede celular (EP) e solúvel (ES) de folhas de berinjela totalmente expandidas. O gel de três fases (separação, 16,5% T e 3,0% C, pH 8,9; intermediário, 9,9% T e 3,0% C, pH 8,9; concentração, 5,12% T e 2,6% C, pH 6,8), foi desenvolvido com tampão do catodo contendo Tris-base 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1 % (pH 8,25), e do anodo contendo Tris-base 0,2 M (pH 8,9). As amostras foram: QTP, 3 μ g de quimotripsinogênio (25.000 Da); MM, padrão de massa molecular de ampla faixa (BioRad), 5 μ L; e PC1, PC2 ou PA de EP ou de ES, 12,5 μ L após diálise, liofilização e ressuspensão em 270 μ L de água ultrapura. O gel foi revelado com Coomassie Brilliant Blue. As setas indicam a presença de peptídios em PC2 de EP e em PC1 e PC2 de ES.

Anexo 2

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

Peptide-Fraction Inhibiting Plant-Pathogen Growth Predominated in Cell-Wall Extracts from Young Plants or in Soluble-Cell Fraction from Expanded-Leaves from Eggplants

H.O. Almeida^{1,2}, E.C. Mattos^{1,2}; M.O. Barbosa^{1,2}; Teixeira, F.R.^{1,2}; R.S. Romeiro³; E.P.B. Fontes^{1,2}; Baracat-Pereira, M.C.^{1,2}.

Author addresses: ¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ²BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36,570-000 Viçosa, MG, Brazil; ³Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36,570-000 Viçosa, MG, Brazil (*correspondence to M.C. Baracat-Pereira. E-mail: baracat@ufv.br)

(With 1 Figure and 1 Table)

Received _____, 2006; accepted _____, 200_.

Keywords: Antimicrobial peptides; solanaceous; *Ralstonia solanacearum*; *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*; plant defense, eggplant.

Corresponding address:

Maria Cristina Baracat-Pereira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFV
36,570-000 Viçosa, MG, Brazil
Phone number: +55 (31) 3899-2919
Fax number: +55 (31) 3899-2864
E-mail: baracat@ufv.br

Additional author:

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
E-mail: bbfontes@ufv.br

Abstract

Some varieties of eggplant are little susceptible to some plant-pathogens, and antimicrobial peptides (AMPs) could be part of this innate defense mechanism. This work aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of cationic and anionic peptide-enriched fractions from cell-wall extracts (CWE) and soluble extracts (SE) from young plants (with 5- and 15-cm-height) and from fully expanded leaves of eggplant against *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. The results indicated that the highest inhibition level of both bacterium growths was obtained with CWE from 5-cm-plants, while SE promoted the highest inhibition rate when 15-cm-height plants or fully-expanded leaves were analyzed. These results suggest that young plants exhibit an innate defense mechanism, very likely involving cell-wall-AMPs action to minimize antimicrobial invasion of plant tissues, while expanded leaves could produce soluble defense molecules in plant tissues.

Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) have been considered as potential therapeutic agents with actions against many pathogens as bacteria, virus and fungi, and anti-cancer or wound-cure actions (Hancock et al., 2003). Biotechnologically, plant-AMPs are thought to be promising model-molecules for the development of commercial agricultural defense compounds or antimicrobial agents to be used in the pharmaceutical or the veterinary industries. Ten classes of AMPs were described in plants (Garcia-Olmedo et al., 1998; 2001), exhibiting common characteristics as cationic, cistein-rich and organ-specific molecules, besides the high content of hydrophobic amino acid residues (up to 50 %) (Hancock et al., 1998; 2002). Very likely, they participate in the constitutive pre-existing defense, and also in the induced response to infections (Garcia-Olmedo et al.,

1998; 2001). The goal of this work was to evaluate the *in vitro* antimicrobial action of peptide extracts of young plants (5 and 15-cm-height) and of fully-expanded leaves from eggplant against the phytopathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*.

Materials and Methods

Plant and micro-organisms

Plant and micro-organism origin, cultivation and maintenance were according to Almeida et al. (2006). Whole-plants with 5-cm and 15-cm, and fully-expanded leaves (60 days-plants) of eggplant (*Solanum melongena*, cultivar Florida Market) were used as peptide sources. *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* were used as plant-pathogenic bacteria in the antimicrobial assays.

Peptide extraction and partial purification

Cell wall extract (CWE) and soluble extract (SE) (Almeida et al., 2006) were obtained from frozen whole-plants or leaves, that were powdered and macerated (1:4, g:ml) with 100 mM Tris-HCl pH 7, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM benzamidine, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 2 mM thiourea. After centrifugation (20,300 x g, 4°C, 30min, BECKMAN), the supernatant was saved, the precipitated was washed twice with water, and the resulting supernatants were combined with the saved one, and hereafter named SE. The precipitate was resuspended (1:2.5, g:ml) in 1.5 M LiCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine and 2 mM thiourea, the mixture was stirred (2 h, 4°C), centrifuged and the supernatant was referred to as CWE. CWE and SE from each source (5-cm, 15-cm plants or leaves) were fractionated with 35% saturated ammonium sulfate (2 h, 4°C), centrifuged and the resulting supernatant was heated (80°C, 15 min) and centrifuged. Supernatants were

dialysed (1000 Da; Sigma, St Louis, MO, USA) against 5 mM Tris-HCl pH 7.0, concentrated and fractionated by ion-exchange chromatography (IEC), in FPLC, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on a 8 ml DEAE-Sepharose (Amersham/GE, Piscataway, NJ, USA) column equilibrated with 25 mM Tris-HCl pH 7.0, at 1.0 ml/min, in absence or presence of 1 M NaCl in the equilibrium buffer (1 ml fractions). Peptides were monitored at A_{280} . Two cationic (CF) and one anionic (AF) peptide-enriched fractions were pooled, dialysed, lyophilized and assayed for antimicrobial activity against the two mentioned plant-pathogenic bacteria.

Peptide antimicrobial assays

The inhibitory activity of peptide-containing fractions was evaluated according to Teixeira et al. (2006), against *R. solanacearum* and *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* by using 96-well plates. The assays consisted of 50 μ L of liquid LB medium (double strength), 10 μ L of the bacterial cell suspension ($A_{560} = 1.2$) from liquid LB culture medium (grown at 28°C) and e 40 μ L of the peptide-enriched fraction (test) or water (culture-control). Only sterile culture medium was used as medium-control. The plates were incubated at 28°C and growth was monitored at A_{560} . Tests were carried out in two replicates. Inhibition rate was determined by comparing A_{560} values from growth in the presence and absence of peptide fractions.

Results and Discussion

CWE and SE were individually separated in two cationic and one anionic fractions after IEC on a DEAE-Sepharose column (Fig. 1). All anionic or cationic-CWE fractions obtained from 5-cm-whole-plants presented the highest growth inhibition rate for both bacteria when compared with 15-cm-plants, whereas the highest antimicrobial activity of anionic and cationic-SE were observed from 15-cm-plants fractions when compared

with 5-cm, except for SE AF. Actually, SE from 5-cm-plant seems to be able to activate bacterial growth, if compared with culture-control. These results suggest that the young plant probably expresses innate defense compounds in the cell-wall, like AMPs, as a way to avoid pathogens invasion, by using the out-cell defense strategy. Fifteen-cm plants probably are producing intracellular molecules as defense, including AMPs. These results corroborate previous data by Nakano et al. 2000, which observed that the cell-walls are the best place to accommodate AMPs with action as the innate-first-defense mechanism of the plant. For leaf extracts, in general, SE presented higher antimicrobial activity than CWE.

For fully-expanded leaves, a Coomassie Brilliant Blue-stained three-phase SDS-Tricine-PAGE (Judd, 1994) showed the presence of peptide in CWE-CF2 and in SE-CF1 and SE-CF2 (Almeida et al., 2006). These previous results are consistent with the high antimicrobial activities observed for these fractions (Table 1).

When extracts from fully-expanded leaves were evaluated, it was observed that the potential for bacterial inhibition seemed to be dependent on the extract concentrations, although in not a linear dependence (Table 1). Different molecules present in those partially purified extracts might promote simultaneously activation and inhibition of bacterial growth. In fact, proteins, peptides and other organic molecules could be acting like carbon sources or bacterial growth elicitors.

In general, the evaluated fractions were more effective in inhibition of *Ralstonia solanacearum* growth, as compared to *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. This result may be biotechnologically relevant since just four among ten classes of plant AMPs are able to inhibit Gram-negative bacterial growth (Garcia-Olmedo et al., 2001). These peptides are unable to create an auto-transport system across bacterial

membranes, and should introduce alternative mechanisms, like interactions with membranes receptors (Tejada et al., 1995).

The chosen bacteria for the antimicrobial test are important plant-pathogens, and act damaging plant commercial cultures. The identifications of AMPs as a potential compound to develop agricultural defensives can represent a promising strategy for control of these pathogenic micro-organisms. Given that AMPs can act synergistically or additively (Giacometti et al., 2005), different peptides could act together to enhance their inhibitory capacity for the control of some plant diseases.

In general, AMPs have been considered as potential molecules for plant defense since they introduce low resistance induction (Heinemann, et al., 2000), low toxicity for animals and few environmental damages (Knight et al., 1997; Gerhardson, 2002; Zasloff, 2002). Therefore, the CWE-CF2, SE-CF1 and SE-CF2 fractions from leaves or SE-CF1 and SE-CF2 fractions from 15-cm-plants or the CWE-CF2 fraction from 5-cm-plants could be successfully exploited to formulate an agricultural defense compound. The characterization of peptides with pathogenic inhibitory activity points out to the development of new biotechnology tools, such as the production of bioreactors (plants or bacteria) overexpressing these defense molecules, or the production of synthetic peptides.

References

Almeida HO, Teixeira FR, Romeiro RS, Silva DJH, Pereira PRG, Fontes EPB, Baracat-Pereira MC. (2006) Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela no controle do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathologica*, in press.

- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**:479-491.
- Garcia-Olmedo F, Rodríguez-Palenzuela P, Molina A, Alamillo JM, López-Solanilla E, Berrocal-Lobo M, Poza-Carrión C. (2001) Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defense. *FEBS Lett* **498**:219-222.
- Gerhardson B. (2002) Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology* **8**:338-343.
- Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C, Licci A, Nadolski P, Riva A, Lukasiak J, Scalise G. (2005) In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients. *Int J Antimicrob Agents* **26**:235–240.
- Hancock REW, Lehrer R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology* **16**:82-88.
- Hancock REW, Rezek A. (2002) Role of membranes in the actives of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* **206**:143-149.
- Hancock REW. (2003) Concerns regarding resistance to self-proteins. *Microbiology* **149**:3343-3344.
- Heinemann JA; Ankenbauer RG, Amibile-Cuevas CF. (2000) Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *DDT* **5**:195-204.
- Judd RC. Electrophoresis of peptides. In: Walker JM (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol 32, *Basic Protein and Peptide Protocols*. Totowa, Humana Press Inc., 1994, pp.49–57.

- Knight SC; Anthony VM, Brady AM, Greenland AJ, Heaney SP, Murray DC, Powell KA, Schulz MA, Spinks CA, Worthington PA, Youle D. (1997) Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Ann Rev of Phytopathology* **35**:349-372.
- Nakano Y, Suzuki N, Yoshida Y, Nezu T, Yamashita Y, Koga T. (2000) Thymidine diphosphate-6-deoxy-L-lyxo-4-hexulose reductase synthesizing dTDP-6-deoxy-L-talose from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Biol Chem* **10**:6806-6812.
- Teixeira FR, Lima MCO, Almeida HO, Romeiro RS, Silva DJH, Pereira PRG, Fontes EPB, Baracat-Pereira MC. (2006) Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *Journal of Phytopathology* **154**:418–421.
- Tejada GM, Pizzaro-Cerda J, Moreno E, Moriyon I. (1995) The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **63**:3054-3061.
- Terras FRG, Schoofs HME, De Bolle MFC, Leuven FV, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue PA, Broekaert WF. (1992) Analysis two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biology Chemistry* **267**:15301-15309.
- Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**:389-395.

Figure Legend

Fig. 1 - Ion-exchange chromatography of soluble (ES, A to C) or cell-wall (CWE, D to F) extracts obtained from 5-cm (A and D), 15-cm (B and E) and fully-expanded leaves (C and F) from 'Florida Market' eggplant variety. Samples were resolved in a DEAE-Sepharose column, using 25 mM Tris-HCl pH 7.0, and flow rate of 1.0 ml/min, in absence or presence (beginning indicate by the arrows) of 1 M NaCl. About 1 ml fraction was collected and peptide automatically monitored at A280. CF1, CF2 and AF correspond to the obtained two cationic and one anionic fractions, respectively.

Table Legend

Table 1 – Antimicrobial activity of the two cationic (CF1 and CF2) and one anionic (AF) fractions obtained from soluble (SE) or cell-wall (CWE) extracts of young-plants (5-cm or 15-cm whole-plants) or fully-expanded leaves of eggplant, cultivar Florida Market

Figure 1

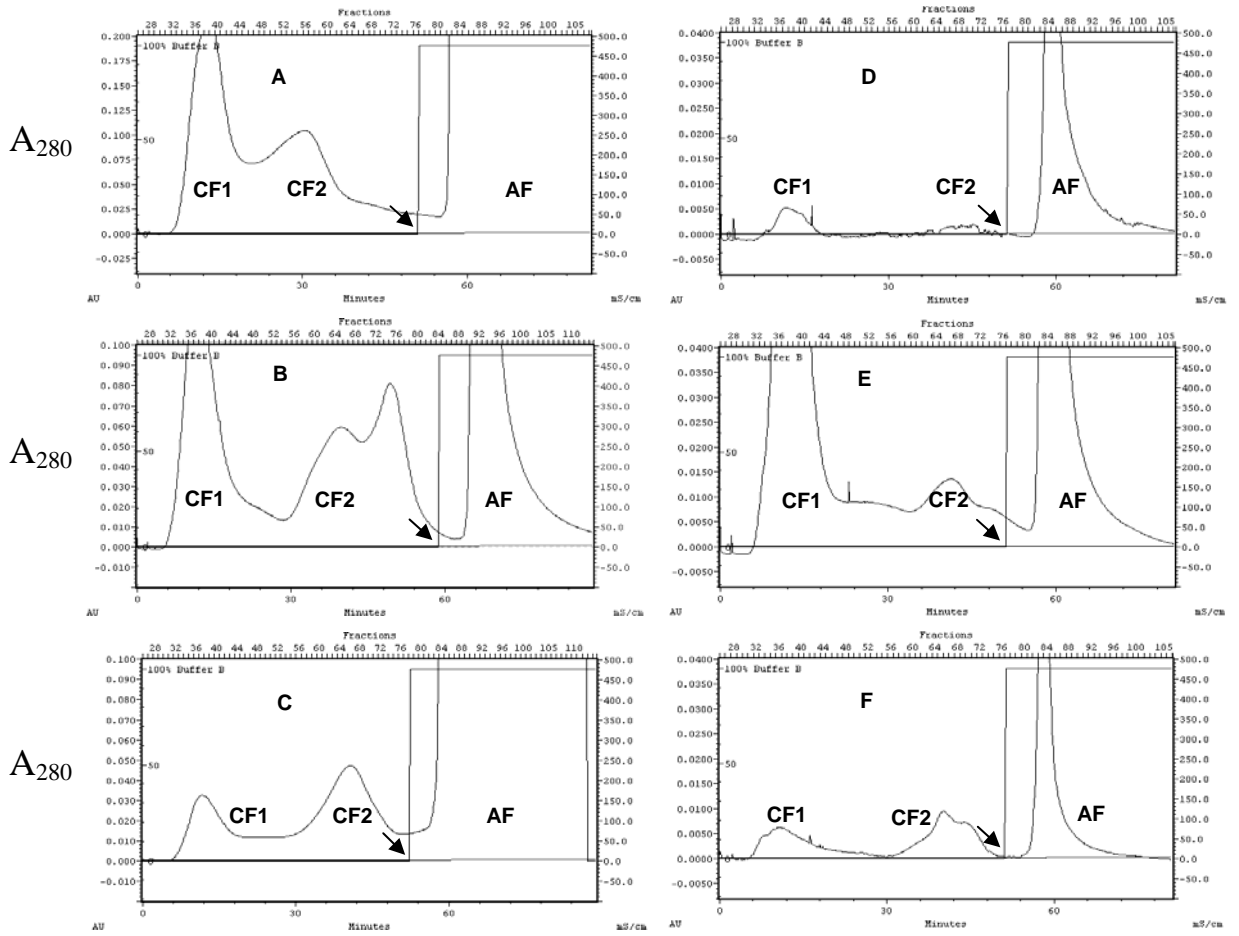


Table 1

Bacterial growth inhibition (%)*				
<i>Ralstonia solanacearum</i>				
Enriched-peptide fractions	5-cm whole-plants (1.25g)**	15-cm whole-plants (1.25g)**	Fully-expanded leaves	
			(0.75g)**	(1.5g)**
SE CF1	-43,3 ± 0,082***	92,2 ± 0,003	90,8 ± 0,004	85,2 ± 0,000
SE CF2	0,75 ± 0,012	86,2 ± 0,001	100 ± 0,003	100 ± 0,001
SE AF	23,9 ± 0,005	14,2 ± 0,001	92,0 ± 0,000	100 ± 0,005
CWE CF1	8,60 ± 0,000	3,70 ± 0,014	1,80 ± 0,001	45,8 ± 0,029
CWE CF2	91,0 ± 0,000	80,0 ± 0,004	29,6 ± 0,019	88,0 ± 0,006
CWE AF	14,2 ± 0,005	0,75 ± 0,007	69,0 ± 0,006	73,4 ± 0,018
<i>Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis</i>				
Enriched-peptide fractions	5-cm whole-plant (1.25g)**	15-cm whole-plant (1.25g)**	Fully-expanded leaves	
			(0.75g)**	(1.5g)**
SE CF1	-47,7 ± 0,019***	53,5 ± 0,028	74,2 ± 0,008	60,4 ± 0,003
SE CF2	-10,0 ± 0,010***	53,3 ± 0,013	80,4 ± 0,001	96,3 ± 0,003
SE AF	-20,3 ± 0,006***	-1,50 ± 0,018***	78,2 ± 0,001	80,4 ± 0,011
CWE CF1	19,8 ± 0,007	0,00 ± 0,019	25,2 ± 0,013	29,7 ± 0,017
CWE CF2	58,4 ± 0,021	50,0 ± 0,004	54,9 ± 0,006	100 ± 0,010
CWE AF	18,8 ± 0,019	5,10 ± 0,021	54,9 ± 0,005	47,8 ± 0,008

* The percentage values refer to the average ± DS, for two replications.

** The antimicrobial activity was determined by using extract amounts that refers to 1.25 g of fresh plant material (for young-plants, 5-cm or 15-cm), or 0.75 g and 1.5 g of fresh fully-expanded-leaf, with cultivation for 14 hours.

*** The negative signal indicates the occurrence of larger growth in presence of the analyzed extract than in culture-control.