

VANESSA DA SILVEIRA RAMOS

**“CLONAGEM, EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Inga laurina* EM RELAÇÃO AOS INSETOS PRAGAS *Diatraea saccharalis* E *Heliothis virescens*”**

CAMPINAS

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**VANESSA DA SILVEIRA RAMOS**

**“CLONAGEM, EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Inga laurina* EM RELAÇÃO AOS INSETOS PRAGAS *Diatraea saccharalis* E *Heliothis virescens*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Vanessa da Silveira Ramos e aprovada pela Comissão Juizadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo  
Coorientadora: Dra. Odalys Garcia Cabrera  
Coorientador: Dr. Goran Neshich

CAMPINAS,  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R147c Ramos, Vanessa da Silveira, 1983-  
Clonagem, expressão e avaliação do potencial biotecnológico de um inibidor de tripsina de *Inga laurina* em relação aos insetos pragas *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens* / Vanessa da Silveira Ramos. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo.  
Coorientador: Odalys Garcia Cabrera. Goran Neshich.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Inibidores da tripsina. 2. Controle biológico. 3. Clonagem. 4. Interação planta-inseto. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Cabrera, Odalys Garcia. III. Neshich, Goran. IV. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Cloning, expression and evaluation of biotechnological potential of *Inga laurina* trypsin inhibitor on insect pests *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*

**Palavras-chave em Inglês:**

Trypsin inhibitors

Biological control

Cloning

Plant-insect interaction

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Maria Lígia Rodrigues Macedo [Orientador]

Jorge Mauricio Costa Mondego

Sérgio Marangoni

Valdirene Moreira Gomes

Octávio Luiz Franco


**Data da defesa:** 26-02-2013

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 26 de Fevereiro de 2013

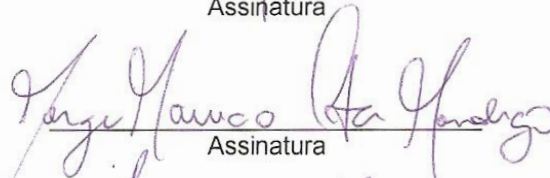
**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo  
(Orientadora)



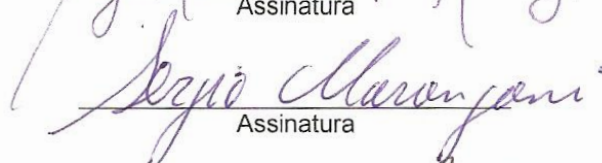
Assinatura

Prof. Dr. Jorge Mauricio Costa Mondego



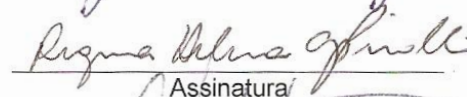
Assinatura

Prof. Dr. Sergio Marangoni



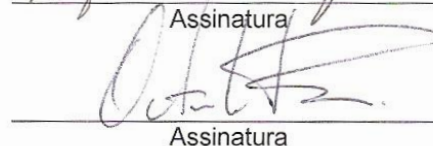
Assinatura

Dra. Regina Helena Geribello Priolli



Assinatura

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco



Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Dra. Andréa Balan Fernandes

Assinatura

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fortaleza espiritual, fonte de sabedoria e inspiração. Pelo amparo e acolhimento nos momentos de angústia.

A meus Pais, Cleonice e Geraldo, exemplos de vida, meu infinito agradecimento. Obrigada pelo incentivo, confiança, por suas orações, palavras de carinho e por sempre estarem ao meu lado. Nada que eu fale ou faça em minha vida é capaz de retribuir tudo que vocês fizeram por mim. Amo vocês!

A minha irmã, Aline, pelo afeto, companheirismo, conselhos e por sempre estimular meu crescimento pessoal e profissional, nem preciso dizer o quanto Te Amo. Ao Gabriel meu sobrinho, presente de Deus, que traz tanta luz e gosto a minha vida, um amor especial.

Ao Ari, que quando tudo dava errado lá estava ele me acalmando e me dando forças para recomeçar. Sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grata por cada gesto carinhoso, cada sorriso e feliz por estar ao seu lado. Obrigada, meu amor. Agradeço também a Dina, pelas orações e por me acolher como sua filha.

À Profa. Dra. Maria Lígia Macedo, por me colocar o desafio de fazer a tese de doutoramento, pela competência científica e orientação dada. Agradeço por esses 11 anos de convivência e por cada etapa vencida.

À Profa. Dra. Odalys Cabrera, minha co-orientadora, pela competência e orientação dada, que me ensinou com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela amizade demonstrada. Sou imensamente grata por tal apoio e afeto. Vai estar sempre presente em meu coração.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Pereira por acreditar em meu potencial e me permitir usufruir da estrutura de seu laboratório. Obrigada pelas conversas, conselhos e injeções de ânimo. Esteve sempre pronto para tentar resolver todos os problemas, que não foram poucos! Serei eternamente grata!

Aos professores Dr. Sérgio Marangoni (LAQUIP/UNICAMP) e Dra Helaine Carrer (CEBTEC/ESALQ) pela pronta disponibilização de seus laboratórios para realização de parte deste projeto. Agradeço também ao Prof. Dr. Marcelo Menossi que me permitiu utilizar a casa de vegetação.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e Neide Graciano Zério do Departamento de Entomologia/ESALQ, por fornecer as lagartas utilizadas nesse trabalho.

À Dra. Daniela Thomazella, Dr. Jorge Mondego e Dra. Ana Deckmann por participarem do exame de qualificação, apresentando importantes sugestões, contribuindo assim para a cuidadosa revisão deste trabalho. Aos membros da banca examinadora: Dr. Sérgio Marangoni, Dra. Regina Priolli, Dr. Octavio Franco e Dr. Jorge Mondego. Muito obrigada pela atenção e disponibilidade.

Aos queridos amigos do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE/UNICAMP) pela troca de experiências na bancada e pela paciência durante a minha transição da área de bioquímica para a de biologia molecular, em especial Alinne, Bruno, Daninha, Eduardo, Marcela, Sil e Tiburcio. Sem esquecer o Luige, Leandro, Gabriel e Paulinho e ao pessoal da bioinformática, Marcelo, Leandro, Lucas e Ramon, muito obrigado Galera!

Aos amigos do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB/UFMS), Caio (muito obrigada por sempre estar disposto a me ajudar), Cezar, Lays (obrigada por tudo Layse!) e Miriam pela ajuda em experimentos e pelo alegre convívio e gargalhadas tão agradáveis e necessárias nos momentos de lazer. A minha amiga Desireé pelo companheirismo e amizade que mantivemos durante esses anos, pelos momentos de alegria e preocupações que dividimos nessa etapa de nossas vidas.

Ao André, Dani, Ênio e Fátima do CEBTEC/ESALQ pela ajuda com a transformação de plantas. Ao Wagner e a Carol do Laboratório de Genoma Funcional (LGF/UNICAMP), muito obrigada.

A toda minha família pelo amor, dedicação e cooperação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

## ÍNDICE

<b>ABREVIACÕES</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
1 - Insetos e danos econômicos .....	3
2 - Interação planta-inseto.....	5
3 - Proteinases e Inibidores de proteinases .....	6
4 - Inibidores de proteinases como ferramenta biotecnológica.....	9
5 - Transformação genética de plantas .....	11
6 - Melhoramento genético de tabaco .....	13
7 - Melhoramento genético de cana-de-açúcar .....	15
<b>III- OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>IV - MATERIAIS</b> .....	<b>20</b>
1 - Espécie Vegetal .....	20
2 - Insetos .....	20
3 - Primers e enzimas .....	21
4 - Vetores para clonagem e expressão .....	22
5 - Gene sintético .....	22
6 - Meios de cultura.....	23
6.1 - Murashige & Skoog pH 5,8 (MS ágar) .....	23
6.2 - Luria-Bertani pH 7,0 (LB).....	23
6.3 – LB/Ágar (2,0%) .....	23
<b>V - MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
1 - Isolamento do inibidor de tripsina de <i>I. laurina</i> (ILTI).....	24
2 - Efeito de ILTI sobre o desenvolvimento larval de <i>D. saccharalis</i> e <i>H. virescens</i> .....	24
3 - Parâmetros nutricionais .....	25
4 - Obtenção das enzimas do fluido intestinal dos insetos .....	26
5 - Preparação das fezes .....	26
6 - Determinação da atividade enzimática.....	26
7 - Efeito de ILTI sobre as enzimas digestivas de diferentes insetos-praga .....	27
8 - Digestibilidade in vitro de ILTI pelas enzimas digestivas de <i>D. saccharalis</i> e <i>H. virescens</i> .....	27
9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	27
10 - Análise estatística .....	28
11 - Isolamento e sequenciamento do gene <i>ilti</i> .....	28
11.1 - Extração de DNA genômico de <i>I. laurina</i> .....	28
11.2 - Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) .....	29
11.3 - Clonagem do gene <i>ilti</i> no vetor pGEM-T Easy.....	31
11.4 - Preparo de células eletrocompetentes ( <i>E. coli</i> ) .....	32
11.5 - Transformação de células eletrocompetentes ( <i>E. coli</i> ) .....	32
11.6 - Seleção dos transformantes .....	32
12 - Expressão da proteína reILTI no vetor pETSUMO .....	33
12.1 - Transformação em <i>E. coli</i> e indução da expressão da proteína recombinante.....	36
12.2 - Purificação de reILTI .....	37
13 - Transformação genética de cana-de-açúcar com gene <i>ilti-s</i> .....	38
13.1 - Material vegetal .....	38

13.2 - Obtenção de calos.....	38
13.3 - Construção do vetor com o gene <i>ilti-s</i> para transformação genética .....	39
13.4 - Preparo das partículas .....	40
13.5 - Transformação de calos embriogênicos via biobalística e seleção dos transformantes.....	44
13.6 - Caracterização molecular das plantas transgênicas.....	45
14 - Transformação genética de <i>Nicotiana tabacum</i> com os genes <i>ilti</i> e <i>ilti-s</i> .....	47
14.1 - Material vegetal .....	47
14.2 - Preparo de células termocompetentes ( <i>A. tumefaciens</i> ) .....	48
14.3 - Construção do vetor com o gene <i>ilti</i> e com o gene <i>ilti-s</i> para transformação genética .....	49
14.4 - Transformação de células termocompetentes ( <i>A. tumefaciens</i> ) e seleção dos transformantes.....	52
14.5 - Preparo do inóculo da linhagem GV0131 de <i>A. tumefaciens</i> .....	53
14.6 - Transformação de discos foliares de tabaco .....	53
14.7 - Análise das plantas de tabaco transformadas .....	54
14.8 – Avaliação do efeito das plantas transgênicas de tabaco sobre o desenvolvimento de <i>H. virescens</i> .....	54
<b>VI - RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
1 - Efeito antimetabólico de ILTI sobre o desenvolvimento larval de <i>D. saccharalis</i> e <i>H. virescens</i> .....	56
2 - Digestibilidade in vitro de ILTI por enzimas digestivas de <i>D. saccharalis</i> e <i>H. virescens</i> .....	57
3 - Consumo e utilização de alimento.....	58
4 - Ação de ILTI na atividade enzimática de <i>D. saccharalis</i> e <i>H. virescens</i> .....	62
5 - Estudo da atividade biológica de ILTI frente às proteinases de diferentes insetos-praga.....	64
6 - Amplificação do gene <i>ilti</i> .....	65
7 - Expressão da proteína SUMO-reILTI em <i>E. coli</i> .....	67
8 - Ação inibitória de reILTI frente a tripsina bovina e as proteinases de <i>D. saccharalis</i> e <i>H. virescens</i> .....	69
9 - Transformação genética de cana-de-açúcar .....	70
9.1 - Confirmação das plantas de cana-de-açúcar transgênicas por PCR.....	73
9.2 - Confirmação da integração do gene <i>ilti-s</i> via sequenciamento.....	74
9.3 - Análise de expressão do gene <i>ilti-s</i> em folhas das plantas de cana-de-açúcar transformadas.....	75
9.4 – Efeito de plantas de cana-de-açúcar transgênicas sobre o desenvolvimento de <i>D. saccharalis</i> .....	77
10 - Transformação genética de tabaco .....	81
10.1 - Confirmação das plantas de tabaco transgênicas por PCR.....	84
10.2 - Confirmação da integração dos genes <i>ilti</i> e <i>ilti-s</i> no genoma da planta via sequenciamento .....	85
10.3 – Efeito de plantas de tabaco transgênicas sobre o desenvolvimento de <i>H. virescens</i> .....	87
<b>VII - DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>VIII - CONCLUSÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>IX- PERSPECTIVAS.....</b>	<b>104</b>
<b>X - REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>



## ABREVIACES

<b>AD</b>	Digestibilidade aparente
<b>BAPNA</b>	N- $\alpha$ Benzoil-DL-Arginil-p-Nitroanilida
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar ao mRNA
<b>CM</b>	Custo metabólico
<b>CTAB</b>	Brometo de cetiltrimetilamnio
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil
<b>DNA</b>	cido desoxirribonuclico
<b>dNTP</b>	Deoxirribonucleosideos Trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
<b>EB</b>	Extrato bruto
<b>ECD</b>	Eficincia de converso do alimento digerido
<b>ECI</b>	Eficincia de converso do alimento ingerido
<b>ILTI</b>	Inibidor de tripsina de <i>Inga laurina</i>
<b>IM</b>	Intestino mdio
<b>IP</b>	Inibidor de proteinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>neo (NPTII)</b>	Neomicina fosfotransferase II
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de base
<b>relTI</b>	Proteína recombinante ILTI

<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>SKTI</b>	Inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz
<b>TAE</b>	Tampão de eletroforese Tris - Acetato - EDTA
<b>TA</b>	Temperatura de Anelamento
<b>T-Nos</b>	Terminador da nopalina sintase
<b>TRIS</b>	Hidroximetil aminometano
<b><i>Ubi</i></b>	Promotor do gene da ubiquitina do milho
<b>UR</b>	Umidade Relativa

## RESUMO

Os inibidores de tripsina têm sido utilizados com sucesso para aumentar a resistência das plantas contra os insetos. No presente trabalho avaliamos a eficiência de um inibidor de tripsina de *Inga laurina* (ILTI) sobre o desenvolvimento de larvas de *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens*, duas importantes pragas da cana-de-açúcar e tabaco, respectivamente. Para estes fins foram utilizadas diversas estratégias (i) purificação da proteína ILTI nativa a partir de sementes de *I. laurina* e sua utilização para suplementação de dieta artificial fornecida como alimento às larvas dos insetos em estudo. Isto com o intuito de avaliar os efeitos do inibidor no desenvolvimento destes indivíduos; (ii) obtenção da sequência de DNA do gene *ilti*, clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante assim como avaliação da sua atividade inibitória; (iii) obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar e tabaco com o gene *ilti* obtido a partir do DNA genômico de *I. laurina* ou do gene *ilti-s* sintetizado quimicamente usando o uso de códons da cana-de-açúcar. A adição de 0,1% (p/p) de ILTI na dieta de *D. saccharalis* não alterou a sobrevivência larval, mas resultou em uma redução de 56% no peso das larvas. As larvas de *H. virescens* que foram alimentadas em uma dieta contendo 0,5% (p/p) de ILTI apresentaram uma redução de 84% no peso. Experimentos *in vitro* mostraram que ILTI não foi digerido pelas proteinases do intestino médio de ambas as espécies de larvas. Ensaio tríptico permitiram observar que não houve alteração nos níveis de tripsina no intestino médio de ambos os insetos. Entretanto, verificou-se uma redução de 55,3% na atividade tríptica das fezes de *D. saccharalis* e um aumento de 24,1% desta atividade nas fezes de *H. virescens*. A atividade da tripsina em ambas as espécies alimentadas com ILTI foi sensível ao inibidor, sugerindo que nenhuma nova proteinase resistente à ILTI foi induzida. Adicionalmente, a proteína recombinante reILTI produzida em *Escherichia coli* apresentou atividade inibitória similar à proteína nativa em testes de atividade anti-tríptica. Com isso, reILTI pode ser considerada como uma potencial ferramenta biotecnológica. Finalmente, larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens* foram alimentadas com plantas transgênicas de cana-de-açúcar e tabaco – respectivamente - expressando os genes *ilti* e/ou *ilti-s*. Os resultados mostraram que os transgênicos foram capazes de interferir no metabolismo dos insetos-praga testados sugerindo que esta estratégia pode ser promissora na obtenção de plantas mais resistentes ao ataque de insetos.

## ABSTRACT

Trypsin inhibitors have been successfully used to increase plant resistance against insects. In this work, we evaluated the efficiency of a trypsin inhibitor from *Inga laurina* (ILTI) on the development of *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*, two important pests of sugarcane and tobacco, respectively. For these purposes, several strategies were employed: (i) purification of the native protein ILTI from *I. laurina* seeds, and its use as a supplement in the artificial diet provided for the insect larvae. This purpose was performed in order to evaluate the effects of ILTI on the development of these individuals, (ii) elucidation of the DNA sequence of the *ilti* gene; cloning, expression and purification of the recombinant protein (reILTI) as well as evaluation of its inhibitory activity, (iii) production of transgenic plants of sugarcane and tobacco with the gene *ilti* from *I. laurina* genomic DNA or the gene *ilti-s*, which was chemically synthesized using the sugarcane codon usage. The addition of 0.1% (w/w) ILTI in the diet of *D. saccharalis* did not alter larval survival but resulted in a reduction of 56% in the weight of the larvae. The *H. virescens* larvae that were fed a diet containing 0.5% (w/w) ILTI showed an 84% decrease in weight. *In vitro* experiments showed that ILTI was not digested by the midgut proteinases of either species of larvae. Triptic assays allowed observe that there was no alteration in the trypsin levels in the midgut of either insect. However, there was a reduction of 55.3% in the triptic activity in the feces of *D. saccharalis* and an increase of 24.1% of this activity in the feces of *H. virescens*. The trypsin activity in both species fed with ILTI was sensitive to the inhibitor, suggesting that no novel proteinase resistant to ILTI was induced. Additionally, reILTI showed similar inhibitory activity to those of the native protein in the anti-tryptic assays. Therefore, reILTI can be considered a potential biotechnological tool. Finally, larvae of *D. saccharalis* and *H. virescens* were fed with transgenic sugarcane and tobacco plants, respectively. The results showed that transgenic plants were able to interfere with the metabolism of these insect pests, suggesting that this is a promising strategy for the production of plants that are more resistant to insect attack.

## I - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, inúmeros avanços estão sendo realizados visando o aumento da produtividade agrícola mundial. Esta preocupação é decorrente do aumento populacional para aproximadamente 8,5 bilhões de pessoas previsto para 2025, sendo assim, necessário um aumento de 50% na produção de alimentos para sustentar o crescimento da população (MOHAN BABU *et al.*, 2003). Outro fator importante que atenta contra a produtividade é a perda na produção agrícola devido ao ataque de pragas, que pode chegar a 20% para as principais culturas (FERRY *et al.*, 2004). Em vista disso, têm sido empregadas várias estratégias a fim de controlar os insetos-praga. Em culturas agrícolas o controle de pragas tradicionalmente é feito pela aplicação de agroquímicos. Entretanto, sabe-se que esse tipo de prática é prejudicial ao meio ambiente, pois atinge de forma inespecífica todos os insetos presentes no ecossistema, além de contaminar lençóis freáticos, podendo ser prejudiciais à saúde do homem (TAMAKI, 2011).

Com o intuito de desenvolver uma agricultura mais consciente em relação à preservação ambiental, os processos de controle de insetos atualmente têm sido dirigidos principalmente para o fortalecimento do próprio sistema de defesa das plantas contra os herbívoros, substituindo o uso de agroquímicos por meios de controle de pragas mais específicos e menos danosos ao meio ambiente (TAMAKI, 2011). Uma estratégia promissora é o desenvolvimento de plantas transgênicas que expressam substâncias cujo alvo é o sistema digestivo dos insetos. Isso porque o tubo digestivo dos insetos é uma importante interface entre o organismo e o ambiente (TERRA e FERREIRA, 1994) sendo, portanto, um potencial alvo para o controle biológico.

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa que incluem barreiras físicas e químicas, além de complexas vias de sinalização, para limitar o consumo de insetos-praga (FALCO *et al.*, 2001; DUNSE *et al.*, 2010). Uma das defesas induzidas pelas plantas, quando são atacadas por insetos, é a rápida síntese de inibidores de proteinases (IPs) (RYAN, 1990). IPs são polipeptídeos que possuem a capacidade de se ligar às enzimas proteolíticas dos insetos fitófagos (FRIZZAS *et al.*, 2004; LINGARAJU e GOWDA, 2008) podendo, assim, reduzir significativamente a atividade proteolítica dessas enzimas. Com isso ocasionam um retardo no crescimento e desenvolvimento do inseto e, conseqüentemente, levam a sua morte (FRANCO *et al.*, 1999).

Durante décadas o uso dos IPs no combate a pragas agrícolas vem sendo estudado e plantas transformadas expressando diferentes inibidores apresentam resultados satisfatórios, fazendo dos IPs uma interessante classe de proteínas vegetais bioinseticidas com potencial biotecnológico para proteção de cultivares (MARCHETTI *et al.*, 2000; ABDEEN *et al.*, 2005).

A presença de inibidores vegetais destaca-se principalmente em sementes de leguminosas, onde são encontrados em altas concentrações (MACEDO *et al.*, 2000). *Inga laurina* é uma árvore pertencente à família Leguminosae, sub-família Mimosoideae. É uma planta tropical com ampla distribuição na América Central e do Sul (LORENZI, 2002). No Brasil, onde é conhecida como ingá branco, está amplamente presente em ambientes urbanos (MACEDO *et al.*, 2007).



Fonte: [alternativarural.com.br](http://alternativarural.com.br)

**Figura 1:** Fruto maduro de *Inga laurina*

Em 2007 nosso grupo publicou a purificação e caracterização bioquímica de um inibidor de tripsina presente em sementes de *I. laurina* (ILTI) abrindo novas perspectivas para a avaliação funcional desta proteína no controle de insetos-praga (MACEDO *et al.*, 2007). Neste cenário, surge o presente projeto com o **objetivo de avaliar o potencial uso de ILTI como uma ferramenta para aumentar a resistência de culturas economicamente importantes contra o ataque de insetos-pragas**. Foram escolhidos para este estudo os insetos *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens*, duas importantes pragas da cana-de-açúcar e do tabaco, respectivamente.

## II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 - Insetos e danos econômicos

Os insetos constituem um grupo extremamente bem sucedido e esse grande sucesso evolutivo é devido à sua capacidade de ocupação dos mais diferentes nichos ecológicos, visto que organismos desse grupo podem aproveitar como alimento quase qualquer material orgânico encontrado na natureza (HAGENS, 1984), podendo ser considerados os principais competidores do homem na Terra. Esta competição se dá, principalmente, pelo ataque direto à produção de alimentos, desde o cultivo até a estocagem dos produtos alimentícios, ou de forma indireta, sendo vetores de grande número de doenças que afetam o homem e os animais de criação (GILLOTT, 1995). Assim, uma proporção significativa do suprimento de alimento mundial é perdida devido à atividade de insetos que são pragas agrícolas (BONNING, 2003).

A agricultura moderna é baseada no sistema de monoculturas cultivadas em grandes extensões de terra, e isso proporciona que as espécies de insetos monófagos, ou seja, que se alimentam apenas de uma determinada espécie de planta, se propaguem rapidamente em um ambiente farto em alimento (GOMES, 2004). Os insetos não apenas provocam perdas na produtividade diretamente devido ao ataque herbívoro, mas também indiretamente por atuarem como vetores de vários patógenos de plantas (nematoides, fungos, bactérias e vírus) (HILDER e BOUTER, 1999). Essas perdas ocorrem mesmo com o uso extensivo de pesticidas e fungicidas e, na ausência de tais medidas de proteção, as perdas poderiam ser ainda maiores. Segundo Lawrence e Koundal (2002), as perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e patógenos, chegam a 70% da produção sem o uso de inseticidas, representando um prejuízo anual de 400 bilhões de dólares.

Insetos pertencentes à ordem Lepidoptera representam um dos mais importantes grupos de pragas no mundo, atacando frequentemente uma ampla variedade de culturas, causando assim significativos danos econômicos (DUNSE *et al.*, 2010). Entre as espécies de lepidópteros que são responsáveis por enormes prejuízos em culturas economicamente importantes, sobressai-se a *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Crambidae), ou broca da cana-de-açúcar, a qual é a principal praga da

cultura de cana-de-açúcar no Brasil e em outros países da América do Sul (GALLO *et al.*, 2002). Os prejuízos causados por esta praga são bastante significativos, provocando danos ao caule das plantas, o que resulta em perda de produção para as indústrias de açúcar e álcool (FALCO e SILVA FILHO, 2003). Além disso, o ataque da broca-da-cana aumenta a susceptibilidade da planta a outros patógenos, permitindo a invasão de microorganismos através do orifício aberto pela lagarta (GALLO *et al.*, 2002). Em lavouras do estado de São Paulo, um nível de ataque de 10% ocasionado pela broca representa uma perda de produção no valor de US\$ 100 milhões por ano, devido somente aos danos indiretos causados pelo complexo de fungos da podridão vermelha (CRUZ *et al.* 2005). *D. saccharalis* também é responsável por danos econômicos a outras culturas, incluindo milho, sorgo e arroz (POMPERMAYER *et al.*, 2001, 2003).



Fonte: Centro de Tecnologia Copersucar

**Figura 2:** Diferentes estágios do ciclo de vida de *D. saccharalis*. (A) Larvas (B) Pupas (C) Adulto.

Outra importante praga desta ordem é a espécie *H. virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera, Noctuidae), a praga do tabaco, que está presente na América do Sul e do Norte. Este inseto é altamente polífago no seu estágio larval e é considerado uma das principais e mais destrutivas pragas do tabaco (BRITO *et al.*, 2001). As lagartas atacam brotos e flores e, na ausência de tecido reprodutivo, atacam tecido foliar (PAIR, 1994). Também são responsáveis por danos nas culturas de algodão, tomate e soja (FITT, 1989, BRITO *et al.*, 2001).





Fontes: [bugguide.net](http://bugguide.net); [commons.wikimedia.org](https://commons.wikimedia.org); [invasive.org](http://invasive.org).

**Figura 3:** Diferentes estágios do ciclo de vida de *H. virescens*. (A) Larva (B) Pupa (C) Adulto.

Em vista desses enormes prejuízos, a proteção dos cultivares contra esses insetos-praga é de fundamental importância para a produção agrícola. Decifrar a interação planta-inseto em nível molecular é um dos assuntos de maior interesse na pesquisa em biologia de plantas (ARRUDA, 2011). A resposta de plantas ao dano de insetos e os mecanismos adaptativos destes insetos têm sido profundamente investigados. Os resultados destes estudos permitem um melhor entendimento da dinâmica da interação entre insetos e plantas e dessa forma abre novos caminhos e perspectivas para um controle biológico de pragas mais eficiente (ARRUDA, 2011).

## 2 - Interação planta-inseto

Por coexistirem há pelo menos 100 milhões de anos, plantas e insetos desenvolveram uma variedade de interações benéficas e deletérias (STOTZ *et al.*, 1999). As plantas dependem dos insetos para dispersão de sementes (BOULAY, 2005) e reprodução (FLEMING, 2007), garantindo assim o sucesso e a perpetuação de sua espécie, enquanto os insetos encontram nas plantas alimento, refúgio ou abrigo e local para acasalamentos, que por sua vez são fatores fundamentais para sua proliferação. Por outro lado, dependendo da intensidade do ataque, insetos fitófagos podem ser prejudiciais às plantas, promovendo injúrias suficientes para levá-las à morte (MARON e CRONE, 2006) ou inviabilizando sua reprodução (PAIXÃO, 2010).

Ehrlich e Raven (1964) foram os primeiros autores a proporem a teoria de coevolução bioquímica, processo no qual a síntese de determinados compostos secundários vegetais

tóxicos estaria diretamente relacionada aos seus predadores, na maioria dos casos, insetos. De acordo com esta teoria um cenário evolutivo pode ser visualizado no qual a produção e acúmulo de uma toxina particular é seguida da resposta recíproca no inseto, como a adaptação por sistemas de detoxificação e excreção, desta forma podendo se alimentar da planta. Como somente algumas espécies adaptam-se a esta, ocorre apenas uma predação limitada gerando um balanço entre a planta e o inseto (LOPES, 2004).

Para escapar do ataque de insetos herbívoros, as plantas desenvolveram variados e eficientes mecanismos de resistência, incluindo barreiras físicas e químicas, bem como respostas induzidas de defesa que se tornam ativadas ante a percepção do organismo invasor (WALLING, 2000; KESSLER e BALDWIN, 2002; AGRIOS, 2005). O sistema de defesa vegetal é multicomponente, atuando de maneira dinâmica e coordenada, no momento e local apropriados e com magnitude adequada (PASCHOLATI e LEITE, 1995). Essa complexidade funcional, espacial e temporal inicia-se com o reconhecimento, pelo hospedeiro, de sinais exógenos provenientes do patógeno, continuam com os mecanismos de transdução desses sinais e resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica (WALTERS *et al.*, 2007). O entendimento completo das bases moleculares da resistência de plantas e da regulação das respostas de defesa permitirá aos geneticistas e melhoristas usar abordagens mais sofisticadas para controle de pragas e patógenos ao aumentar as defesas naturais das plantas.

### **3 - Proteinases e Inibidores de proteinases**

Para crescerem, se desenvolverem e se reproduzirem, os insetos em geral requerem os mesmos aminoácidos essenciais que os mamíferos (MOREIRA, 2007). Esses aminoácidos essenciais devem ser obtidos de uma dieta proteica e, para isso, os insetos aparentemente alimentam-se de todos os compostos orgânicos, de madeira a folhas, flores, raízes, tuberos, néctar e sementes (MURDOCK e SHADE, 2002; FORTUNATO *et al.*, 2007). Essa plasticidade pode ser explicada pela diversidade de enzimas digestivas que podem ser encontradas no intestino médio desse grupo de organismos, conferindo-lhes as habilidades de consumir e utilizar com eficiência uma grande variedade dos recursos alimentares (TERRA *et al.* 1996).

Os aminoácidos essenciais para a manutenção das funções vitais nos insetos são obtidos com o auxílio de proteinases digestivas, encontradas no intestino médio do trato digestivo desses insetos, que catalisam a liberação de peptídeos e aminoácidos de proteínas ingeridas na dieta (TAMAKI, 2011). Caso a hidrólise das proteínas seja interrompida, os alimentos ingeridos podem se acumular no intestino dos insetos, diminuindo a ingestão de alimentos e a predação de plantios e estoques por praga. Em última instância, a não digestão das proteínas alimentares pode levar os organismos à morte devido à baixa disponibilidade de aminoácidos, atingindo níveis letais (OLIVEIRA *et al.*, 2005) portanto, a digestão de proteínas é um processo vital aos organismos.

Insetos fitófagos apresentam serino e cisteíno-proteinases como principais enzimas digestivas (HAQ *et al.*, 2004). As serino-proteinases são as principais enzimas hidrolíticas detectadas no intestino médio dos insetos da ordem Lepidoptera (PARDE *et al.*, 2010), dentre as quais destacam-se as tripsinas, quimiotripsinas e elastases. Por constituírem importantes enzimas digestivas presentes praticamente em todos os organismos vivos (GEOFFROY *et al.*, 1990), essas enzimas têm sido alvos frequentes nos estudos de tentativa do controle de insetos-praga (TAMAKI, 2011).

Durante a alimentação nos tecidos das plantas, os insetos encontram uma série de defesas bioquímicas, as quais podem ser constitutivas ou sintetizadas em resposta ao ataque dos insetos. Acredita-se que o mecanismo de defesa induzida, além de proteger contra o ataque dos insetos herbívoros, atua diminuindo os custos fisiológicos da defesa quando os insetos não estão presentes (STOTZ *et al.*, 1999). A maioria dos muitos compostos de defesa sintetizados pelas plantas são metabólitos secundários pequenos e não proteicos, como alcalóides, terpenóides e flavonóides (PIUBELLI *et al.*, 2005), além de proteínas de defesa, como os inibidores proteicos de proteinases (DE LEO *et al.*, 2001).

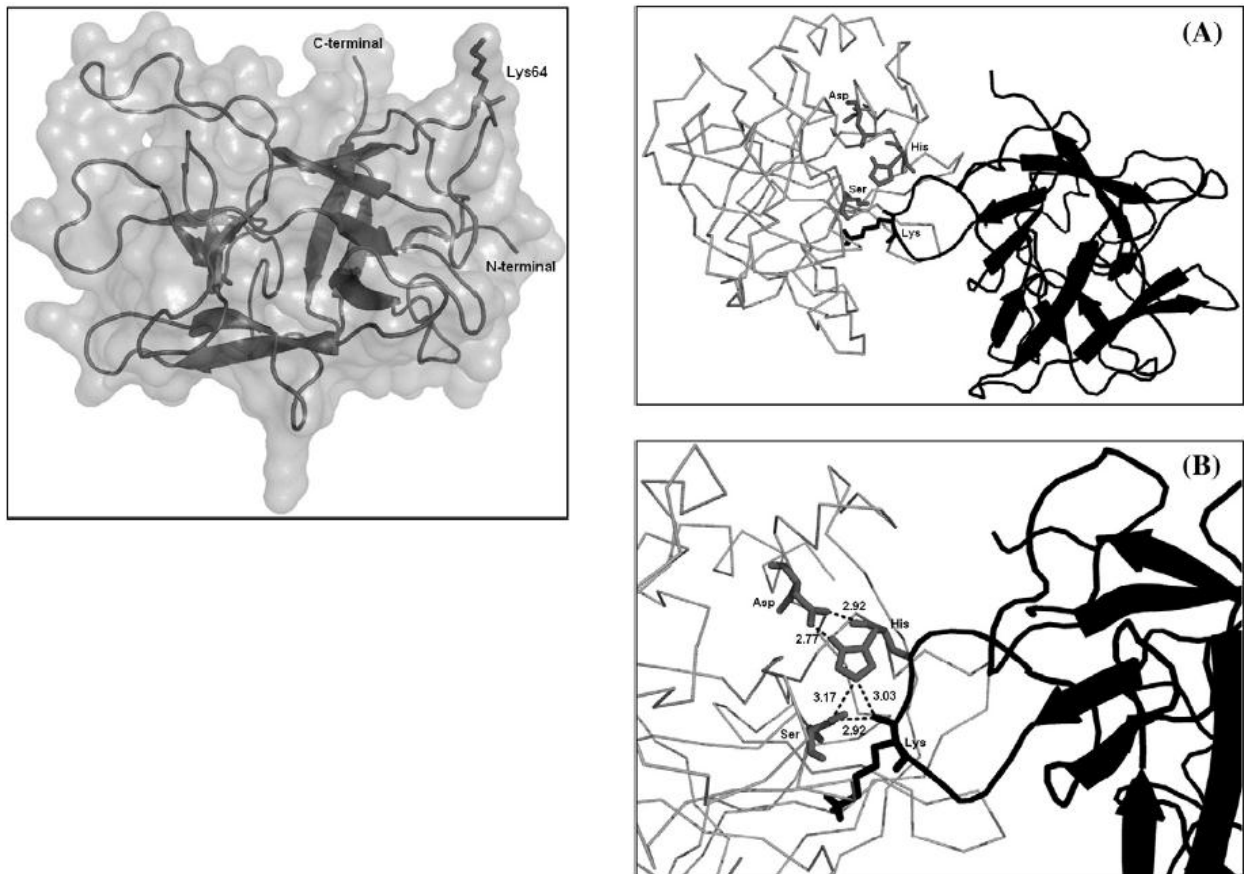
Um dos mecanismos de defesa mais bem estudado é a produção de IPs, que são proteínas presentes em praticamente todas as plantas, capazes de se ligar às enzimas digestivas dos insetos, inibindo a sua atividade proteolítica de forma competitiva. Esta inibição se dá pela ligação do sítio ativo da enzima à região reativa do inibidor no intestino médio do inseto (SILVA-FILHO e FALCO, 2000), formando complexos estáveis com as proteinases alvo, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima (BIRK, 2003). Em tecidos de plantas mais vulneráveis ao ataque de herbívoro, os IPs são

defesas constitutivas, como nas sementes, ou podem ser induzidas por danos mecânicos, por exemplo, quando o inseto se alimenta de uma folha (SILVA-FILHO e FALCO, 2000).

A ingestão dos IPs pelos insetos herbívoros interfere no processo de degradação das proteínas no intestino médio, sendo considerados agentes antimetabólicos, por causarem deficiência proteica nos insetos (FAN e WU, 2005). Os seus efeitos são atribuídos a sua interferência direta na digestão proteica, diminuindo a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (OLIVA *et al.*, 2010). Há ainda outra hipótese de que os inibidores afetem o desenvolvimento de forma indireta, através de um mecanismo de “feedback”, que levaria a uma hiperprodução de proteinases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis, deslocando aminoácidos para síntese de mais proteinases em detrimento de outras proteínas essenciais (BROADWAY, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Dessa forma, o estudo da eficácia do efeito antinutricional dos inibidores no desenvolvimento de insetos-praga é importante para disponibilizar novas maneiras de proteger plantas cultivadas.

Em 2007, nosso grupo publicou a sequência primária de um inibidor de tripsina a partir de sementes de *Inga laurina* (ILTI), caracterizado por ter uma única cadeia polipeptídica com 180 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 20 kDa (MACEDO *et al.*, 2007). ILTI é um inibidor do tipo competitivo e foi agrupado na família Kunitz de inibidores de serino-proteinases de plantas, tendo em base a similaridade de sua sequência de aminoácidos. No entanto, ILTI contém apenas uma ponte dissulfeto diferente da maioria dos outros inibidores Kunitz (MACEDO *et al.*, 2007). Recentemente, ILTI mostrou uma forte atividade inibitória contra a tripsina de *Homalinotus coriaceus*, praga do coco (MACEDO *et al.*, 2011). Na Figura 4 podemos observar a representação da estrutura tridimensional de ILTI, além da região N-terminal e C-terminal, está presente o aminoácido lisina localizado na posição 64 (Lys64). Tal resíduo está presente no sítio reativo de ILTI e é reconhecido, especificamente, pelo sítio de ligação primário da enzima tripsina (Figura 4A), e por isso é denominado resíduo P1. Esta característica, a presença de uma lisina na posição P1, determina que ILTI seja específico para serinoproteases do tipo tripsina. Na figura 4B, ainda é possível observar as interações moleculares formadas durante o complexo enzima-inibidor. O átomo de oxigênio do resíduo de Lisina 64 interage com o

grupo hidroxila do resíduo de Serina 195, formando uma ponte de hidrogênio de 2,92 Å. Esta interação é favorecida pela atração que os resíduos Histidina 57 e Aspartato 102 promovem ao redor do resíduo Serina 195, também representada na figura 4B como linhas pontilhadas (MACEDO *et al.*, 2011). Além das pontes de hidrogênio, outros elementos como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas estão envolvidos nas interações entre os inibidores e as proteases (BIRK, 2003).



**Figura 4:** Representação da estrutura tridimensional do inibidor de tripsina de *Inga laurina*. (A) Visão geral da formação do complexo entre o inibidor e a enzima tripsina e (B) detalhe da interação entre o resíduo de Lisina 64 e os resíduos da tríade catalítica (Ser195, His57 e Asp102) presentes no sítio catalítico durante a formação do complexo (adaptado de MACEDO *et al.*, 2011).

#### 4 - Inibidores de proteinases como ferramenta biotecnológica

Evidências da função de defesa dos inibidores de proteinases em plantas têm sido comprovadas em diversos experimentos, ressaltando a importância destes como candidatos ao uso nas estratégias de controle de insetos. Os efeitos deletérios dos

inibidores contra insetos-praga têm sido descritos tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (LINGARAJU e GOWDA, 2008; BHATTACHARYYA *et al.*, 2007).

Lipke e colaboradores (1954) reportaram que inibidores de tripsina de soja inibiam o crescimento e a atividade proteolítica *in vitro* de *Tribolium confusum* (besouro da farinha). Pompermayer e colaboradores (2001) avaliaram a propriedade antimetabólica do inibidor de proteinase de soja (SPI) em relação às larvas de *D. saccharalis* e observaram que a adição de 0,5% (p/p) deste inibidor em dieta artificial causava redução na taxa de crescimento e desenvolvimento deste inseto. Ramos e colaboradores (2009), quando alimentaram *Anagasta kuehniella* com dieta artificial contendo 0,7% (p/p) do inibidor presente em sementes de *Plathymentia foliolosa*, observaram uma redução significativa na sobrevivência e no peso médio larval deste inseto. Resultados similares foram observados por Macedo e colaboradores (2010) em um experimento realizado com dietas artificiais contendo uma concentração de 1,0% (p/p) de inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina*, o qual ocasionou uma redução de 50% no peso e na sobrevivência larval de *A. kuehniella*.

Além dos experimentos utilizando dietas artificiais, a construção de plantas transgênicas trouxe importantes avanços científicos, permitindo a geração de plantas mais resistentes aos diferentes tipos de pragas. Após o desenvolvimento de plantas contendo genes que expressam toxinas proteicas do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), considerado um dos marcos pioneiros nesta nova abordagem (ANDREWS *et al.*, 1987), genes endógenos das plantas, codificando principalmente inibidores de proteinases de insetos-praga, foram introduzidos em diferentes espécies de plantas com o objetivo de controlar fitófagos (HILDER *et al.*, 1987; JOUANIN *et al.*, 1998). Essa inserção de genes de inibidores de proteinases em plantas tem sido explorada por se tratar da transferência de um gene de defesa de uma espécie de planta para outra, o que, teoricamente, geraria menor rejeição perante a sociedade, em comparação com a transferência de um gene de uma bactéria para uma planta, como é o caso de plantas *Bt* (BOULTER, 1993; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Um grande número de plantas de interesse comercial já foi transformado com gene de inibidores de proteinases provenientes de outras plantas (JOUANIN *et al.*, 1998; SCHULER *et al.*, 1998). Em 1997, Yeh e colaboradores produziram plantas transgênicas

de tabaco (*Nicotiana tabaccum*) resistentes a *Spodoptera litura*, um lepidóptero predador das folhas desta espécie. As plantas foram modificadas com a introdução de um gene que codifica um inibidor de tripsina presente em *Ipomoea batatas* (batata-doce). O inibidor de tripsina, MTI-2, presente em sementes de mostarda foi eficiente contra larvas de *Plutella xylostella*, quando expresso em plantas de *Arabidopsis thaliana*, causando altos níveis de mortalidade e uma acentuada redução no desenvolvimento deste inseto (DE LEO *et al.*, 2001). MTI-2 também foi eficiente contra *Mamestra brassicae*, quando expresso em folhas de fumo transgênicas e contra *Spodoptera litoralis*, quando expresso em sementes de granola (DE LEO *et al.*, 2001). Em 2010, Dunse e colaboradores expressaram inibidores de proteinases em plantas de algodão e estas foram mais resistentes ao ataque de insetos-praga. Na revisão bibliográfica de Fan e Wu (2005) são apresentados mais de 50 trabalhos de plantas transgênicas expressando inibidores de diferentes famílias resistentes a insetos-praga.

No entanto, como resultado de pressões seletivas, insetos herbívoros desenvolveram vários mecanismos de adaptação para superar os efeitos defensivos de IPs (GATEHOUSE, 2011). Entre esses mecanismos, podemos mencionar a superexpressão de enzimas sensíveis aos IPs (DE LEO *et al.*, 1998.), a clivagem proteolítica dos IPs por proteinases dos insetos (GIRARD *et al.*, 1998a, YANG *et al.*, 2009) e a expressão de proteinases que são insensíveis aos IPs (BRITO *et al.*, 2001; JONGSMA *et al.*, 1995). Esta adaptação é um resultado do processo de co-evolução entre insetos e plantas. Um possível modo para obter resultados satisfatórios usando IPs no controle de pragas seria avaliar o potencial de IPs de espécies vegetais bastante separadas evolutivamente daquelas cujos insetos são predadores (FALCO e SILVA-FILHO, 2003).

## **5 - Transformação genética de plantas**

Pesquisas relacionadas ao melhoramento genético têm levado a aumentos consideráveis na produtividade de diversas espécies cultivadas através de variadas abordagens metodológicas para obtenção de maior ganho genético após a seleção. As principais vantagens do uso das plantas geneticamente modificadas são: aumento na produção (BETZ *et al.*, 2000) e a redução na aplicação de inseticidas (ROMEIS *et al.*, 2006), principalmente os, de largo espectro, favorecendo a manutenção de inimigos

naturais (GOULD, 1998), que auxiliam no controle de pragas e contribuem para retardar a evolução da resistência (MASCARENHAS e LUTTRELL, 1997).

A transformação genética de plantas surgiu no final da década de 80, como uma ferramenta atrativa e de alto potencial no auxílio do melhoramento tradicional. Atualmente mostra-se como uma técnica bastante viável (FALCO, 1998), na qual um fragmento definido de DNA é introduzido no genoma do hospedeiro, ou genoma receptor, devendo ser a ele integrado (BRASILEIRO e DUSI, 1999). A inserção estável dessas moléculas em um genoma hospedeiro dá origem a um indivíduo igual ao receptor da molécula recombinante, porém acrescido de uma característica nova e particular (QUECINI e VIEIRA, 2001).

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas. Essas técnicas estão basicamente agrupadas em duas categorias: transformação indireta e direta. A transformação indireta é aquela em que o DNA exógeno de interesse é inserido no genoma vegetal pela ação de um vetor biológico, realizado, principalmente, pela transferência do DNA de interesse por bactérias do gênero *Agrobacterium* enquanto a transformação direta é baseada em processos físicos e/ou bioquímicos (PICELLI, 2010).

A transformação indireta, mediada por bactérias fitopatogênicas de solo do gênero *Agrobacterium*, é a estratégia mais comum para transformar plantas, principalmente por ser um sistema simples, eficiente e barato. Possui ainda a vantagem de produzir plantas transgênicas com um número limitado de cópias do transgene, já que a inserção é geralmente um evento preciso (DE BLOCK, 1993). O uso da *Agrobacterium tumefaciens* como vetor de transformação exige que a linhagem esteja “desarmada”, isto é, sem a presença dos oncogenes em seu plasmídeo. No lugar dos genes retirados, serão colocados genes de interesse e/ou marcadores de seleção, que vão ser transferidos e integrados ao genoma vegetal, sem afetar a regeneração (BRASILEIRO e DUSI, 1999; KLEE *et al.*, 1987). Porém, muitas espécies ou cultivares de cereais e gramíneas (monocotiledôneas), apesar dos avanços na técnica e a escolha de estirpes de bactérias mais específicas à cultura em questão, encontram ainda certas resistências a esse método de transformação (PICELLI, 2010).



Dos métodos que utilizam DNA introduzido diretamente no genoma das plantas, apenas dois são de importância prática: a eletroporação e a biobalística.

A transformação por eletroporação consiste na indução temporária de poros nas membranas celulares dos protoplastos, produzidos por um campo elétrico, permitindo assim, a passagem de íons e moléculas, como a molécula de DNA. Entretanto, o isolamento e cultivo de protoplastos é um processo laborioso e difícil, restringindo a transformação genética de métodos que dependam dessa fase, como, por exemplo, a eletroporação (FALCO, 1998). Esse método é pouco utilizado para monocotiledôneas (BIRCH, 1997).

Já o método da biobalística consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carregando o DNA para o interior da célula (FERREIRA *et al.*, 2004). São utilizados microprojéteis de ouro ou tungstênio, nos quais são precipitadas as moléculas de DNA. Parte dos projéteis, que carregam as moléculas de DNA, atinge o núcleo da célula vegetal e libera o DNA precipitado que, em baixa frequência e de forma aleatória, é integrado no genoma (KLEIN *et al.*, 1987). O tipo de aparelho usado para acelerar as micropartículas envolvidas pelo DNA pode ter propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade (FERREIRA *et al.*, 2004).

## **6- Melhoramento genético de tabaco**

Atualmente, o Brasil produz mais de 650.000 toneladas de tabaco por ano sendo um dos maiores produtores do mundo (SILVA, 2007). Além disso, é considerado o maior exportador mundial de fumo, em volume (AFUBRA, 2005). O setor fumageiro exerce grande importância na atividade econômica e social do país. No total, considerando a soma dos empregos diretos e indiretos gerados pelo fumo desde o seu plantio até a comercialização do cigarro, há o envolvimento de aproximadamente 2,4 milhões de pessoas que de alguma forma estão vinculadas ao setor (AFUBRA, 2005). Segundo o pesquisador Amadeu A. Bonato, do Departamento de Estudos Socioeconômicos Rurais do Paraná, o Brasil vive um paradoxo entre a redução do número de fumantes e o aumento da produção de fumo em virtude das exportações. Isso porque o fumo brasileiro possui duas características visadas pelo mercado internacional, boa qualidade e baixos custos.

Além disso, o tabaco possui um histórico estabelecido como planta-modelo para a transformação genética vegetal. As maiores vantagens do tabaco incluem sua alta taxa de regeneração *in vitro*, seu genoma relativamente pequeno (o que facilita as manipulações moleculares), o alto rendimento de biomassa (mais de 100.000 kg por hectare), o potencial de produção rápida em larga-escala devido ao ciclo curto e à grande produção de sementes, e pela facilidade com que a análise genética da herança dos genes introduzidos pode ser realizada (LEMOS, 1997, DUNG *et al.*, 2006).

A primeira planta transgênica de tabaco foi obtida por Zambryski e colaboradores (1983), através da expressão de um gene de *Agrobacterium tumefaciens* (opalina). *Nicotiana tabacum* também foi utilizada para obtenção de transgênicos resistentes a vírus (POWELL-ABEL *et al.*, 1986), tolerantes a herbicidas (COMAI *et al.*, 1987) e resistentes a insetos-praga. Em 1987, Hilder e colaboradores obtiveram a primeira planta de tabaco transgênica expressando um gene de inibidor de tripsina do feijão *Vigna unguiculata*. Essas plantas apresentaram resistência a uma grande variedade de insetos-praga, incluindo Lepidópteros do gênero *Heliothis* e *Spodoptera*, Coleópteros do gênero *Diabrotica* e *Anthonomous* e Ortoptera do gênero *Locusts* (GATEHOUSE e GATEHOUSE, 1998). Este foi o ponto de partida para a utilização de plantas transgênicas expressando inibidores de proteinases como uma estratégia alternativa para o controle de insetos-praga.

Johnson e colaboradores (1989) obtiveram plantas de tabaco transgênicas expressando um potente inibidor de tripsina/quimiotripsina de tomate. Larvas de *Manduca sexta* alimentadas com folhas deste transgênico apresentaram um retardado significativo no crescimento. Posteriormente, plantas de tabaco contendo um inibidor de tripsina de *Curcubita máxima* (CmTI) e a toxina Cry1Ab mostraram um aumento de 6 vezes na atividade inseticida contra *Heliothis virescens* quando comparadas com plantas expressando apenas a toxina Cry1Ab (MACINTOSH *et al.*, 1990). Em 1994, McManus e colaboradores expressaram em tabaco um inibidor de quimiotripsina de batata obtendo uma redução no crescimento das larvas de *Chrysodeixis eriosoma* que se alimentaram das plantas transgênicas.

## 7 - Melhoramento genético de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no Brasil e no mundo. A cultura vem sendo cultivada em regiões tropicais e subtropicais em diversos países, sendo o Brasil o seu maior produtor com cerca de 570 milhões de toneladas numa área de aproximadamente 6,7 milhões de hectares (FNP, 2010). O Estado de São Paulo concentra a maior produção de cana-de-açúcar do país, correspondendo a 60% da safra brasileira (União da indústria de cana-de-açúcar – ÚNICA, 2009).

A agroindústria canavieira é responsável por gerar milhões de empregos na área, o que evidencia a importância social da cultura (RIBEIRO, 2007), com a geração de divisas através da exportação de açúcar e álcool e pelo aproveitamento racional da biomassa vegetal. O bagaço da cana-de-açúcar é de grande interesse para o setor energético, podendo ser utilizado na co-geração de energia elétrica. As fibras podem ainda servir de matéria-prima para diversos produtos como papel, ração animal, etc. O emprego destes resíduos que anteriormente eram descartados contribui para o desenvolvimento sustentável e para a geração de recursos do Brasil (FELIX, 2006).

A transformação genética de cana-de-açúcar tem seu espaço em várias linhas de pesquisa e é amplamente estudada. A primeira planta de cana-de-açúcar geneticamente transformada foi obtida com sucesso em 1992 por Bower e Birch, através da técnica de biobalística utilizando calos de cana-de-açúcar como material alvo. As plantas transformadas obtidas continham o gene *neo* (*nptII*), que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase II, a qual confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos (canamicina e geneticina). No mesmo ano, Chowdhury e Vasil bombardearam calos embriogênicos de cana-de-açúcar com o gene *bar*, porém, não conseguiram regenerar nenhuma planta transgênica, provavelmente devido à idade e tipo de calo utilizado nos experimentos de transformação. A produção de plantas resistentes a herbicida é uma prática comum (FALCO *et al.*, 2000, MANICKAVASAGAM *et al.*, 2004) e o desempenho agrônomico e estudos da herdabilidade em plantas que contêm esta característica já foram executados no campo (LEIBBRANDT e SNYMAN, 2003; BUTTERFIELD *et al.*, 2002).

Os enormes prejuízos acarretados pela infestação da broca-da-cana têm levado os cientistas a buscar incorporar características de resistência a esse inseto nos programas

de melhoramento, por exemplo, com o uso da transgenia. Exemplos de melhoramento genético usando técnicas de transgenia são conhecidos na literatura, embora ainda não exista cultivares comerciais de cana disponíveis (MEDEIROS, 2008). A maioria das tentativas foi realizada utilizando genes da toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*, com o objetivo de aumentar a resistência a brocas que atacam o colmo. Arencibia e colaboradores (1997), produziram plantas de cana-de-açúcar pela transformação com uma versão truncada do gene cryI(A)b de *B. thuringiensis*, embora a produção de proteína tenha sido muito baixa, as plantas apresentaram uma leve atividade larvicida.

Braga e colaboradores (2003) produziram plantas de cana-de-açúcar resistentes à *D. saccharalis* usando uma versão reconstruída de cryI(A)b. Estas plantas transgênicas apresentaram alta resistência sob condições de estufa e de campo. Por outro lado, Weng e colaboradores (2006) usaram uma versão truncada do gene cryI(A)c obtendo níveis de resistência à broca.

Outras estratégias já foram utilizadas para obter plantas de cana-de-açúcar resistentes a insetos, usando genes de várias fontes. Nutt e colaboradores (1999 e 2005) obtiveram plantas transgênicas de cana-de-açúcar que expressavam no primeiro caso, o inibidor de proteinase II da batata, e no segundo trabalho, o gene da lectina de *Galanthus nivalis*. Os autores mostraram uma redução no peso das larvas de coleópteros de solo que se alimentam das raízes dessas plantas. Ribeiro (2007) superexpressou o gene da canacistatina, um inibidor de cisteíno-proteinase para controle de pragas da ordem Coleoptera. Falco e Silva-Filho (2003) expressaram em cana-de-açúcar os inibidores de tripsina Kunitz e Boman-Birk de soja, obtendo uma redução no crescimento das lagartas da broca da cana-de-açúcar que se alimentaram das plantas transgênicas.

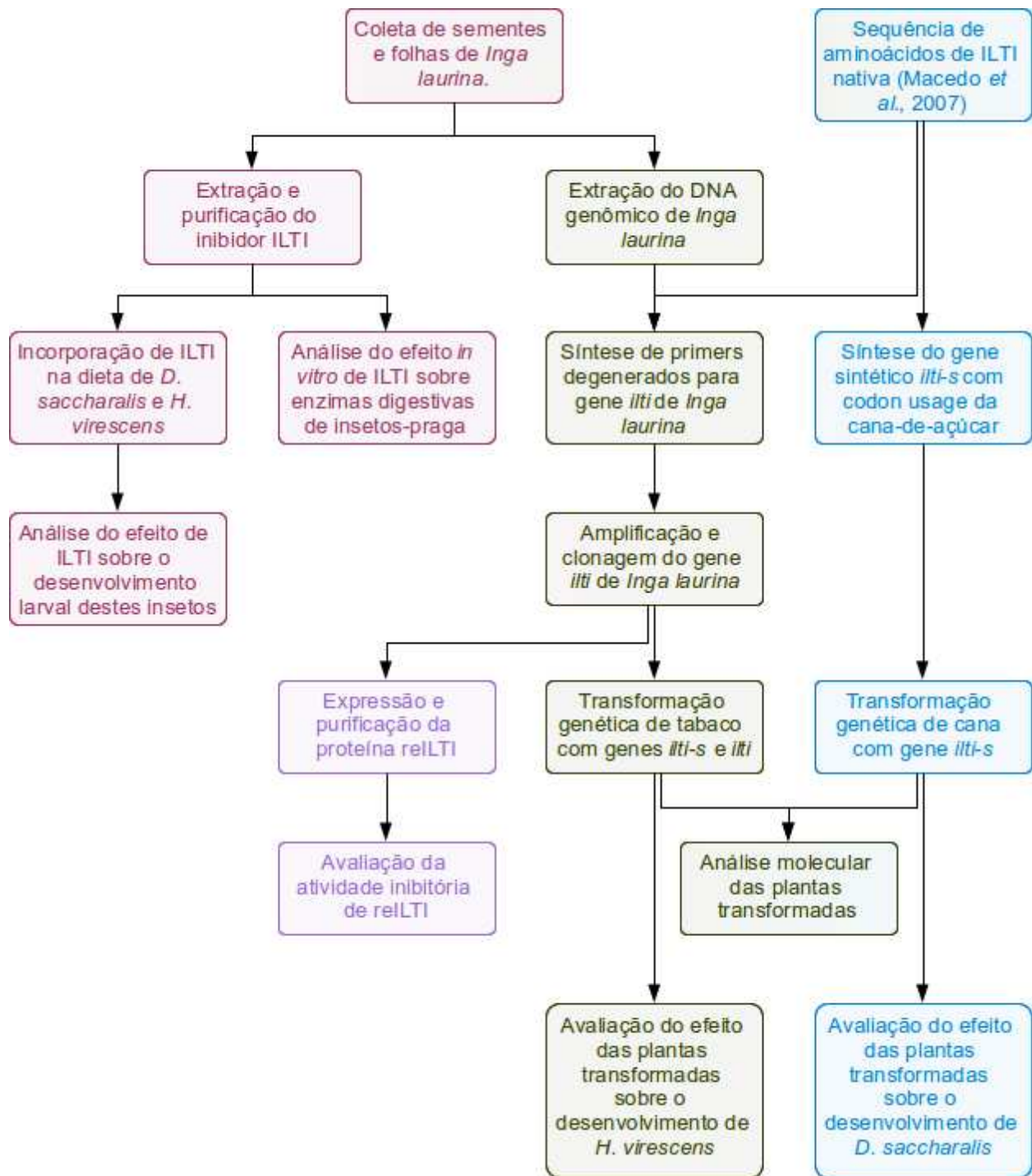
Neste contexto, a transformação genética pode ser empregada nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar para inserção de transgenes visando à obtenção de variedades tolerantes a diferentes estresses biótico e abiótico. Além de produzir bons produtos agrícolas, a tecnologia de transformação genética oferece também a possibilidade de estudar os milhares de genes de plantas que foram identificados pelos programas genomas conduzidos em todo o mundo nos últimos anos (DONG *et al.*, 2005).

O controle genético utilizando plantas transgênicas que superexpressam genes de IPs poderá trazer, portanto, uma enorme contribuição para o controle de insetos-praga, diminuindo a utilização de inseticidas químicos nocivos ao meio ambiente e garantindo ainda, uma maior produtividade e qualidade da matéria-prima final.

### III- OBJETIVOS

1. Avaliar a eficácia de ILTI nativo (purificada a partir de sementes de *I. laurina*) como uma ferramenta antinutricional em relação ao desenvolvimento dos insetos-praga *D. saccharalis* e *H. virescens* através da ingestão de dieta artificial suplementada com ILTI.
2. Obter a sequência nucleotídica do gene *ilti*, utilizando-se *primers* degenerados desenhados a partir da sequência de aminoácidos.
3. Clonar o gene *ilti*, expressar e purificar a proteína recombinante ILTI (reILTI) em *E. coli*. Avaliar a atividade inibitória de reILTI em relação a tripsina bovina e as proteinases presentes no intestino médio das larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens*.
4. Clonar o gene *ilti* em vetor de transformação. Transformar plantas de cana-de-açúcar e tabaco, através das técnicas de biobalística e via *Agrobacterium*, respectivamente.
5. Analisar as plantas transformadas quanto à presença do gene e produção da proteína recombinante. Avaliar o efeito das plantas transformadas sobre suas respectivas pragas.

A estratégia de trabalho seguida para atingir os objetivos propostos está apresentada na Figura 5.



**Figura 5:** Fluxo experimental do projeto. Etapas realizadas com inibidor purificado de sementes (vinho). Etapas realizadas com proteína recombinante (roxo). Etapas realizadas com o gene *ilti* e *ilti-s* (verde). Etapas realizadas com o gene *ilti-s* (azul).

## IV - MATERIAIS

### 1 - Espécie Vegetal

As sementes e folhas de *I. laurina*, foram coletadas na cidade de Campo Grande, no Estado de Mato Grosso do Sul (Brasil) e foram utilizadas para extração do inibidor – ILTI.

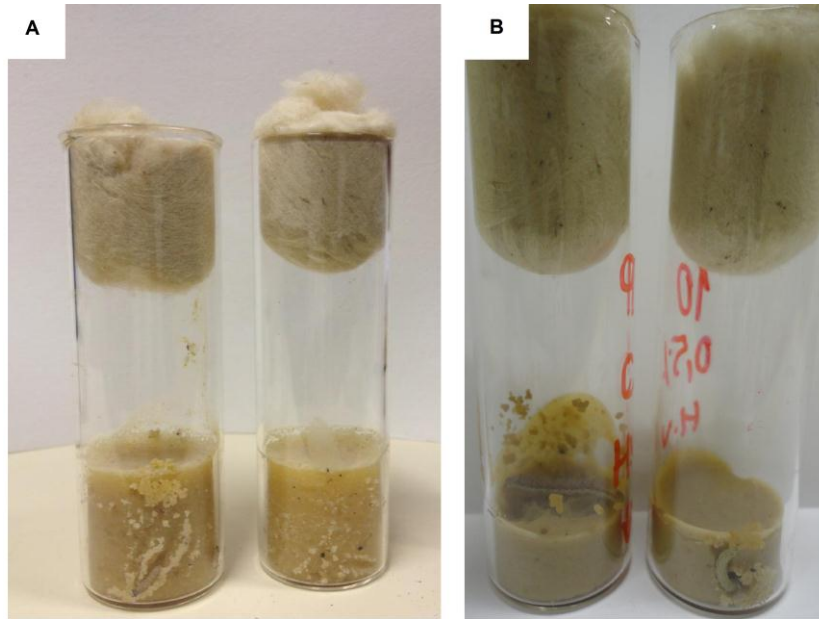


Fonte: todafruta.com.br

### 2 - Insetos

Duas espécies de insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) e *H. virescens* (Fabricius, 1777) (Figuras 2 e 3, respectivamente), foram cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Entomologia, ESALq, Piracicaba-SP. *D. saccharalis* e *H. virescens* foram mantidas em dietas artificiais, de King e Hartley (1985) e Parra e Mihsfeldt (1992), respectivamente. A metodologia de criação adotada para as espécies foi aquela proposta por Parra (1996), utilizando-se tubos de vidro 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, mantendo-os a  $25 \pm 2$  °C, UR de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14/10 h de claro/escuro (Figura 7).





Larvas de *Spodoptera frugiperda* (praga do milho), *Agrotis ipsilon* (praga que ataca soja, algodão, feijão e milho) e *Tuta absoluta* (praga do tomate) também foram cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e utilizadas em ensaio *in vitro*.



**Figura 8:** (A) larva de *S. frugiperda*, (B) larva de *A. ipsilon* e (C) larva de *T. absoluta*.

### 3 - Primers e enzimas

Os *primers* foram construídos a partir da sequência de proteína de interesse e adquiridos comercialmente da empresa IDT. As enzimas de restrição utilizadas nos

experimentos de biologia molecular foram adquiridas das empresas Promega, New England Biolabs e Fermentas.

#### 4 - Vetores para clonagem e expressão

- Para a subclonagem do gene *ilti* e *ilti-s* foi utilizado o vetor pGEM-T Easy (Promega).
- Para a clonagem de *ilti-s* em cana-de-açúcar foi utilizado o vetor pUBILN (CAMARGO, 2007).
- Para a clonagem de *ilti* e *ilti-s* em tabaco foram utilizados os vetores pRT104 (TOPFER *et al.*, 1987) e pCAMBIA2301 (Cambia, Austrália).
- Para a expressão de *ilti* foi utilizado uma versão modificada do vetor pETSUMO (Invitrogen).

#### 5 - Gene sintético

O gene sintético (*ilti-s*) que codifica ILTI foi adquirido comercialmente da empresa IDT. Foi desenhado tendo em base no uso de códons de *Saccharum officinarum* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4547>). A sequência de *ilti-s* pode ser conferida na Figura 9.

```
1  ATGAGCATAACCGCGCGCCGCGCACCTCCTCGTGCTCCTCTCCGTCCTAGCTGCCATCTCCCTCTCGTGCGGCGCCGCGGGC
81  GGAAGTGGTGGTCGATTCCGATGGCGAAATGCTGCGCAATGGCGGCAAGTACTACCTCTCCCCGGCGAARCCCGATTGGCG
161  GCGGCGCCATTATTTCCGCCGCGATCAGGCATGGCGATCACCTCTGCTCCCTCGCCGTCGTCTCCGCGCGCTATACCAAC
241  GGCTGGGCCGTGACCATCTCCTCCCTTACAAGGCCGCGTTCATTAAGACCTCCTGGCCTCTGAACCTCCGCTTCGCCTA
321  TCTGGCCCCGAATGTGTGCACTAACTCCCCTAACTGGGTGGTCGTCAAGTACAAGTCCAGGTCCCTGGGCGAAGCCGTCA
401  TGCTGGGCGACAAGCAAGAGTTCGGCAACGCGTTCGTGTCCGGCTCCTTCTCCATCGAGACTCACGATACCGAAAAGCAT
481  CATTATAAGCTGGTGTITTAGGCAGCAGGGCCAGGATGAATCCGCCAACATCGGCGTCAAACCTCGACTCCGAAGATCGCCG
561  CCGCCTGGTCGTCACCGATAAGGAGGCCCTGATCTTCAAGTTCGACAAGGTGAAGGACAAT
```

## 6 - Meios de cultura

### 6.1 - Murashige & Skoog pH 5,8 (MS ágar)

<u>Macronutrientes</u>	<u>Micronutrientes</u>	<u>Fe-EDTA</u>	<u>Outros</u>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1,65 g/L) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (0,44 g/L) KNO <sub>3</sub> (1,9 g/L) MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,37 g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,17 g/L)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (6,2 g/L) MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (1,69 g/L) ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (8,6 g/L) KI (0,83 g/L) Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (0,25 g/L) CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (25 mg/L) CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O (25 mg/L)	FeSO <sub>4</sub> (1,39 g/L) EDTA (1,86 g/L)	Vitaminas de Gamborg. sacarose (25 mg/L) ágar (8 g/L)

### 6.2 - Luria-Bertani pH 7,0 (LB)

10 g/L de peptona

5 g/L de extrato de levedura

10 g/L de NaCl

### 6.3 – LB/Ágar (2,0%)

2,0% de ágar em 1 L de LB (m/v)

## V - MÉTODOS

### 1 - Isolamento do inibidor de tripsina de *I. laurina* (ILTI)

ILTI foi obtido de acordo com o método descrito por Macedo e colaboradores (2011). As sementes de *I. laurina* sem tegumento foram moídas e peneiradas para obtenção de uma farinha de fina granulação, a qual foi submetida à delipidação com hexano. A farinha delipidada foi submetida a uma extração proteica com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante *overnight* em temperatura de 4 °C. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 7.500 x g durante 30 min a 8 °C, o sobrenadante foi separado e dialisado por 24 h contra água destilada a 4 °C, liofilizado e denominado Extrato Bruto (EB). A fração liofilizada (50 mg) foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, e aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose (2 x 20 cm) equilibrada previamente com o mesmo tampão, em um fluxo de 30 ml/h. A fração que apresentou atividade anti-trípica na coluna DEAE-Sepharose (5 mg) foi aplicada em uma coluna de troca iônica HiTrap Q Sepharose (5 ml), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, em um fluxo de 30 ml/h. A detecção das proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280 nm. A quantificação da proteína foi realizada usando o método de Bradford (1976).

### 2 - Avaliação de ILTI sobre o desenvolvimento larval de *D. saccharalis* e *H. virescens*

Para avaliar o efeito de ILTI no desenvolvimento dos insetos, larvas neonatas foram colocadas em tubos de vidro cobertos com algodão, e ILTI foi adicionado à dieta artificial a uma concentração de 0,1% para *D. saccharalis* e 0,5% para *H. virescens*. Uma dieta controle, sem o inibidor, também foi preparada. Entre as concentrações testadas de ILTI, os valores de 0,1% e 0,5% de inibidor para *D. saccharalis* e *H. virescens*, respectivamente, foram escolhidos porque o efeito de ILTI na sobrevivência das larvas nestas concentrações foi considerado adequado para experimentos *in vivo*. O tratamento para *D. saccharalis* foi composto por dez repetições contendo quatro larvas (n = 40), e o tratamento para *H. virescens* foi composto por vinte repetições contendo uma larva por tubo (n = 20). A diferença no número de repetições entre os tratamentos foi devido (i) às diferenças de tamanho das larvas das duas espécies, (ii) diferenças de comportamento e (iii) às quantidades de proteína ILTI necessária para os testes. No final do quarto ínstar, o

peso, o número de larvas, o consumo larval e a produção fecal foram analisados para a avaliação dos parâmetros nutricionais. A atividade trípica dos extratos do intestino médio e das fezes também foi determinada.

### 3 - Parâmetros nutricionais

Os parâmetros nutricionais foram comparados entre as larvas de quarto ínstar alimentadas com dieta controle e dieta suplementada com ILTI. As larvas foram pesadas, mortas por congelamento e levadas à estufa (50 °C), juntamente com a sobra da dieta e as fezes existentes nos tubos, visando à obtenção do peso de sua matéria seca, do alimento consumido, do ganho de peso das larvas, essenciais para determinação dos índices de consumo e utilização de alimento.

Para a determinação dos índices de nutrição quantitativa da fase larval, adotou-se a metodologia proposta por Waldbauer (1968) e Farrar e colaboradores (1989). Para o cálculo destes índices, foram utilizados os seguintes parâmetros (em peso de matéria seca):

**B** = peso médio das larvas

**I** = peso do alimento ingerido

**F** = peso das fezes produzidas

**I-F** = alimento assimilado

Foram determinados os índices de consumo e utilização para cada tratamento, por meio da análise de quatro parâmetros: Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM) e Digestibilidade Aproximada (AD), através das seguintes fórmulas:

**ECI** – estima a percentagem do alimento ingerido que foi transformado em biomassa.

$$ECI = \frac{B}{I} \times 100$$

**ECD** – estima a percentagem do alimento digerido convertido em biomassa.

$$ECD = \frac{B}{I-F} \times 100$$

**CM** – representa a porcentagem do alimento metabolizado em energia para manutenção dos processos vitais.

$$CM = 100 - ECD$$

**AD** – representa a porcentagem do alimento ingerido que é efetivamente assimilado pelo inseto. É uma aproximação da tomada real de nutrientes através das paredes do intestino.

$$AD = \frac{I-F}{I} \times 100$$

#### **4 - Obtenção das enzimas do fluido intestinal dos insetos**

Larvas de quarto ínstar de *D. saccharalis*, *H. virescens*, *S. frugiperda*, *Agrotis ipsilon* e *Tuta absoluta*, foram imobilizadas em nitrogênio líquido e tiveram seus intestinos removidos com o auxílio de pinças. Os intestinos foram congelados em nitrogênio líquido e macerados. O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e quantificado através da metodologia desenvolvida por Bradford (1976) e utilizado imediatamente como fonte de enzimas nos ensaios enzimáticos ou então armazenado a -20 °C.

#### **5 - Preparação das fezes**

Fezes das larvas de quarto ínstar de *D. saccharalis* e *H. virescens* foram coletadas e estocadas a -20 °C. Para utilização nos ensaios enzimáticos, as fezes foram homogeneizadas em tampão Tris 0,05 M, pH 8,0 e centrifugadas a 20.000 x g por 10 min a 4 °C, e os sobrenadantes foram imediatamente utilizados.

#### **6 - Determinação da atividade enzimática**

Com a finalidade de analisar a resposta das proteinases de *D. saccharalis* e *H. virescens* frente à ação de ILTI, a atividade das enzimas do tipo tripsina presentes nos extratos do intestino médio e fezes destas larvas, alimentadas em dieta controle e dieta contendo ILTI, foi determinada pela hidrólise do substrato específico BAPNA (N- $\alpha$  Benzoil-DL-Arginil-p-Nitroanilida) seguindo a metodologia desenvolvida por Erlanger e colaboradores (1961). Os extratos foram incubados com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 a 37 °C por 10 min. Após incubação, 200  $\mu$ l de BAPNA a 1 mM foi adicionado, completando

um volume final de 270 µl/poço. O tempo total do ensaio foi de 30 min. A mudança na absorbância a 410 nm subtraída a leitura da solução do branco foi detectado no leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices). O ensaio foi realizado em triplicata.

### **7 - Efeito de ILTI sobre as enzimas digestivas de diferentes insetos-praga**

A atividade inibitória de ILTI foi testada contra as proteinases intestinais de (1) *D. saccharalis* e *H. virescens* alimentados em dieta controle ou dieta contendo inibidor e (2) *S. frugiperda*, *A. ipsilon* e *T. absoluta* alimentadas em dieta artificial. BAPNA (1 mM) foi utilizado como substrato. Diferentes concentrações de ILTI foram incubadas junto a concentrações fixas de extratos intestinais. Após o período de incubação de 10 min a 37 °C, 200 µl de substrato foram adicionados, completando o volume final de 270 µl, e o ensaio decorreu durante 30 min. O ensaio foi acompanhado a 410 nm e a porcentagem de inibição contra cada extrato intestinal foi calculada após a subtração de seus respectivos brancos, levando em consideração que a atividade enzimática máxima foi obtida na ausência do inibidor. Para cada concentração de inibidor três replicatas foram preparadas.

### **8 - Digestibilidade *in vitro* de ILTI pelas enzimas digestivas de *D. saccharalis* e *H. virescens***

ILTI foi dissolvido (2 mg/ml) em tampão Tris 0,01M, pH 8,0. Os extratos de intestino médio das larvas foram preparados de acordo com o método descrito detalhadamente no item 4. Para a realização do ensaio de digestibilidade *in vitro*, ILTI foi incubado com extrato de intestino médio na proporção de 1:10 (p/p). Os ensaios foram realizados à temperatura de 37 °C, nos intervalos de tempo 0, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h e a reação foi interrompida por imersão dos tubos em água a 100 °C por 2 min. As proteínas foram em seguida separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

### **9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). A eletroforese foi conduzida em uma cuba, com gel de concentração com 5% de acrilamida, e gel de separação com

12,5% de acrilamida. As amostras e o marcador de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra para eletroforese. As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular foram: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa). A corrida eletroforética foi realizada com corrente constante (30 mA) e voltagem livre. O gel foi corado com solução de Coomassie Blue 0,1% overnight e o excesso de corante removido em ácido acético 7%.

## **10 - Análise estatística**

Os dados obtidos nos ensaios bioquímicos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo *teste de Tukey* ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa *Instat*.

## **11 - Isolamento e sequenciamento do gene *ilti***

### **11.1 - Extração de DNA genômico de *I. laurina***

A extração de DNA genômico de *I. laurina* foi realizada utilizando o protocolo de CTAB (brometo de cetil-trimetil-amônio) descrito por Doyle e Doyle (1990). Folhas jovens de *I. laurina* foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de um cadinho e pistilo de porcelana. As folhas maceradas foram distribuídas em tubos de microcentrífuga eppendorf e foram adicionados 500  $\mu$ l de tampão de extração previamente aquecido a 65 °C (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol). Os tubos foram submetidos à agitação no vórtex e incubados a 60°C por 30 min. Após incubação os tubos foram mantidos à temperatura ambiente, posteriormente foi adicionado 500  $\mu$ l de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) e os tubos foram submetidos à agitação no vórtex e centrifugação por 15 min, 18.000 x g a 4 °C. A fase aquosa (fase superior) foi removida e submetida novamente a extração com clorofórmio:álcool isoamílico. Foi adicionado 3,0  $\mu$ l de RNase (10 mg/ml) e as amostras foram incubadas por 20 min a 37 °C. Para a precipitação do DNA genômico foi adicionado 0,7 vezes o volume coletado de isopropanol e as amostras foram misturadas suavemente. O precipitado de DNA foi obtido por centrifugação a 18.000 x g durante 30 min a 4 °C.



Depois da lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuscitado em 20 µl de água MilliQ autoclavada. O DNA foi estocado a 4 °C.

### 11.2 - Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

O gene *ilti* foi amplificado por PCR diretamente do DNA genômico usando *primers* degenerados (Tabela 1), que foram desenhados tendo em base a sequência de aminoácidos da proteína ILTI publicada por Macedo e colaboradores (2007). A reação de amplificação foi realizada em volume final de 20 µl utilizando 15 pmol/µl de *primers* (direto e reverso), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTP, 2,0 µl de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 1U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen) e como molde 20 ng de DNA genômico de *I. laurina*.

O programa utilizado para a PCR foi constituído pelas seguintes etapas: 1) desnaturação inicial do DNA molde a 94 °C por 3 min; 2) a temperatura de desnaturação é mantida por mais 50 s; 3) mudança da temperatura para respectiva TA (Temperatura de Anelamento) (ver Tabela 1) para anelamento dos *primers* durante 50 s; 4) para extensão a temperatura foi alterada para 72 °C, mantida por 1 min; 5) Para a amplificação de *ilti* os passos 2 a 4 foram repetidos por 30 vezes. Após os 30 ciclos, um último ciclo de extensão de 7 min a 72 °C foi realizado. A reação de amplificação foi conduzida em termociclador (Veriti, Applied Biosystems).

O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0%, utilizando voltagem constante de 90 V durante 30 min. O gel de agarose foi preparado dissolvendo a agarose em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, pH 8,0 e 1 mM EDTA) ao qual foi adicionado 2,5 µl de Brometo de etídio (10 mg/ml) (AMRESCO). Após a separação eletroforética, o gel foi fotodocumentado em fotodocumentador (ChemiDoc System- Bio Rad).

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *ilti*.

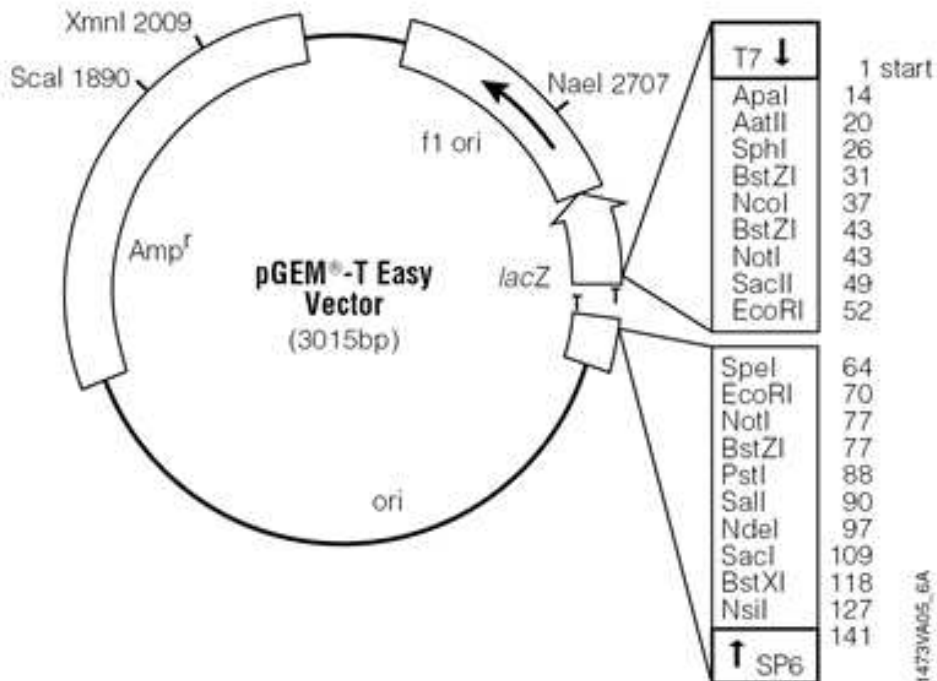
<b>Isolamento de <i>ilti</i></b>			
<b><i>Primers</i></b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Sequência nucleotídica obtida</b>	<b>TA (°C)</b>
1) <b>ILTI-F-1</b> (Direto)	GTHGAYWSHGAYGGHGARATGYTHMG	16 ao 339	57
2) <b>ILTI-F-2</b> (Direto)	ATGYTHMGHAAAYGGHGGHAARTAYTA		57
3) <b>ILTI-F-3</b> (Direto)	GTHTGYACHAAYWSHCCHAAYTGG		57
4) <b>ILTI-R-1</b> (Reverso)	CCRAAYTCYTGYYTTRTCHCCHARCAT		57
5) <b>ILTI-R-2</b> (Reverso)	CCDATRTHGCHSWYTCRTCYTGHC		57
6) <b>ILTI_F_int</b> (Direto)	GGGTCGTCGTAAGTCTCGTAG	12 ao 441	56
7) <b>ILTI_F_333pb</b> (Direto)	TGCCTTTGTTTCTGGTTCGTTTC	10 ao 534	52
8) <b>ILTI_R1_fim</b> (Reverso)	ATTRCCTTNACCTTRTCGAACTTG		52
9) <b>ILTI-F4inicio</b> (Direto)	GAGGTBGTBGTBGTBGBACTCWGACGGC	1 ao 534	56
10) <b>ILTI-Rfinal</b> (Reverso)	ATTGTCCTTGACCTTGTTCGAACTTG		56
11) <b>M13</b> (Direto) Sequenciamento pGEM	GTAAAACGACGCCGCCCA	-	50
12) <b>M13</b> (Reverso) Sequenciamento pGEM	AACAGCTATGACCATG	-	50

\*Código degenerado: B= C/G/T; D= A/G/T; H= A/C/T; K= G/T; M= A/C; N= A/C/G/T; R= A/G; S= C/G; V= A/C/G; W= A/T; Y= C/T

### 11.3 - Clonagem do gene *ilti* no vetor pGEM-T Easy

O fragmento amplificado por PCR foi clonado no pGEM-T Easy (Promega) (Figura 10), um vetor linearizado adequado para clonagem de produtos de PCR. Este apresenta timidinas adicionadas às suas extremidades 3', permitindo uma melhor compatibilidade de tais extremidades com o produto de PCR gerado pela *Taq DNA polimerase*, já que esta enzima adiciona desoxirriboadenosina ao terminal 3' dos fragmentos amplificados na PCR. Adicionalmente, a presença das timidinas aprimora a eficiência de ligação dos produtos de PCR, pois previne a recircularização do vetor. O pGEM-T Easy também apresenta o sítio múltiplo de clonagem inserido no gene *lacZ*, que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase, o que possibilita a identificação dos clones recombinantes através da diferente coloração das colônias na presença e ausência desta enzima e de compostos análogos à galactose ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

A clonagem do gene *ilti* no vetor pGEM-T Easy foi executada seguindo as especificações do *kit*. O produto da reação de ligação (pGEM-*ilti*) foi usado para transformar bactérias eletrocompetentes da linhagem DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Invitrogen). O vetor possui o gene que codifica para a  $\beta$ -lactamase que confere resistência a ampicilina.



**Figura 10:** Mapa do vetor pGEM-T Easy. Extraído de pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems – Technical Manual.

#### **11.4 - Preparo de células eletrocompetentes (*E. coli*)**

O preparo de bactérias eletrocompetentes foi realizado segundo o protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (2001). Uma colônia da cepa de interesse crescida em meio Luria Bertani (LB) sólido (sem antibiótico no caso da linhagem DH5α) foi inoculada em 5 ml de LB líquido e cultivada por 16 h a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm (pré-cultura).

Uma alíquota de 1 ml da pré-cultura foi utilizada para inocular 100 ml de LB. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação até atingir a absorbância de 0,6 a 600 nm. Após esse tempo a cultura foi incubada no gelo por 10 min, e as células coletadas por centrifugação a 4000 x g por 15 min a 4 °C. Então o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 ml de água ultrapura, estéril e gelada. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas em 100 ml de solução de glicerol 10% estéril e gelada. A suspensão celular foi novamente centrifugada a 4000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspensado em 240 µl de glicerol 10% estéril e gelado. Alíquotas de 40 µl desta suspensão bacteriana foram feitas e armazenadas a -80 °C.

#### **11.5 - Transformação de células eletrocompetentes (*E. coli*)**

Uma alíquota de bactérias eletrocompetentes da linhagem DH5α de *E. coli* foi retirada do freezer -80 °C e mantida em gelo. Nesta alíquota foi adicionado 5 µl do produto de ligação (pGEM-*it1*), ficando as células incubadas no gelo durante 2 min. Em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta de eletroporação de 0,1 cm (gelada) e a esta foi aplicado um pulso de 2,5 kV/cm. Imediatamente foi adicionado 1 ml de meio LB líquido. Depois de incubar 1h a 37 °C, uma alíquota de 150 µl da suspensão celular foi plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina (50 µg/ml) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil-beta-galactopiranosídeo) (30 mg/ml).

#### **11.6 - Seleção dos transformantes**

A identificação de transformantes foi feita através da coloração diferenciada das colônias crescidas na placa, branca e azul, esta última devida à clivagem do X-gal pela

enzima  $\beta$ -galactosidase. Esta enzima não é expressa no caso da ligação de um inserto no vetor, pois isso ocorre no meio do gene que codifica a  $\beta$ -galactosidase, assim as colônias brancas são positivas para a ligação do inserto de interesse no vetor (SAMBROOK, 1989). O antibiótico foi utilizado para seleção das células que contêm o plasmídeo.

Os possíveis clones recombinantes foram cultivados em 5 ml de meio LB contendo ampicilina durante 16 h sob agitação constante a 37 °C. As culturas foram então centrifugadas a 1.700 x g por 10 min e os plasmídeos recombinantes foram purificados com o sistema de mini preparação de plasmídeo PureLink Hipure Plasmid DNA purification (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

A confirmação dos clones transformantes com o gene recombinante foi realizada por PCR usando *primers* degenerados (direto: ILTI-F4início e reverso: ILTI-Rfinal, Tabela 1), por análise de restrição com a enzima *EcoRI* e por sequenciamento em ambas direções utilizando os *primers* M13 direto e M13 reverso (Tabela 1) e o protocolo do kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. As amostras foram aplicadas em sequenciador (3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems), os cromatogramas resultantes foram analisados utilizando o programa Chromas e as sequências foram analisadas utilizando a ferramenta BLAST disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

## **12 - Expressão da proteína relTI no vetor pETSUMO**

Os *primers* construídos para clonagem e sequenciamento do gene no vetor pETSUMO estão listados na tabela a seguir:

**Tabela 2:** *Primers* utilizados para clonagem e sequenciamento do gene *ilti* no vetor pETSUMO. A região sublinhada corresponde ao sítio de restrição inserido.

<b>Clonagem e sequenciamento</b>			
<b><i>Primers</i></b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Sítio de restrição</b>	<b>TA (°C) utilizada na PCR</b>
<b>ILTI_BamHI_F</b> (Direto) Clonagem em pETSUMO e sequenciamento	<u>GGATCC</u> GAGGTGGTGGTGGACTCAG	<i>Bam</i> HI	61
<b>ILTI_Sall_R</b> (Reverso) Clonagem em pETSUMO e sequenciamento	GTCGACCTAATTGTCCTTGACCTTGT <u>CG</u>	<i>Sall</i>	61
<b>T7</b> (Direto) Sequenciamento	TAATACGACTCACTATAGGG	-	53
<b>T7</b> (Reverso) Sequenciamento	CTAGTTATTGCTCAGCGG	-	53

Os *primers* ILTI\_BamHI\_F e ILTI\_Sall\_R foram desenhados com o intuito de amplificar um fragmento para a subclonagem no vetor pGEM-T Easy e, posteriormente, clonagem no vetor de expressão pETSUMO, em fase de leitura correta. Para tanto, foram adicionados aos *primers*, sítios de restrição para as endonucleases *Bam*HI e *Sall* (Tabela 2, bases sublinhadas), os quais estão presentes no vetor pETSUMO. O gene *ilti* foi então amplificado por PCR utilizando esses *primers*. Em seguida o produto de PCR foi ligado ao vetor pGEM-T Easy, e após a seleção dos clones positivos, o fragmento correspondente a sequência da proteína foi removido por meio das enzimas de restrição (*Bam*HI/*Sall*) e ligado no vetor pETSUMO (versão modificada; ver a seguir), digerido com as enzimas de restrição correspondentes. Para a realização das reações de digestão do plasmídeo e do gene, assim como para a reação de ligação foram seguidas as recomendações dos fabricantes das enzimas utilizadas.

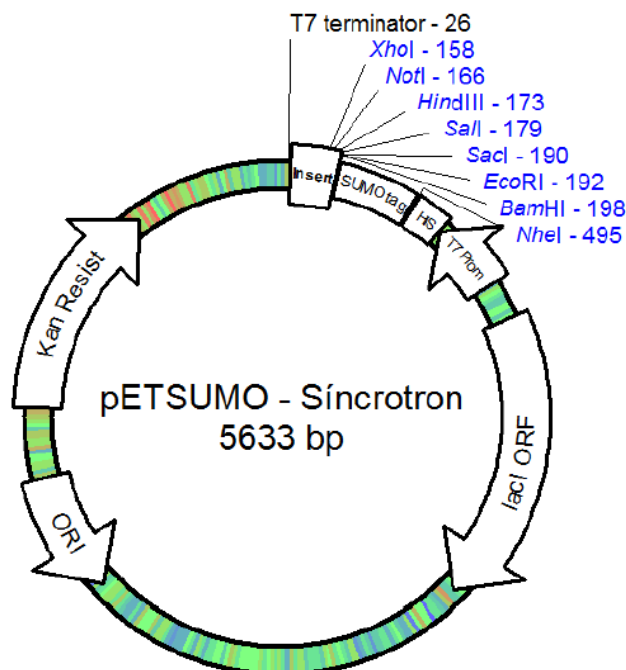
Uma vez realizada a reação de ligação se procedeu à transformação do produto da reação em linhagem de *E.coli* (DH5α) eletrocompetente, utilizando o protocolo descrito no

item 11.5. A seleção dos transformantes foi realizada por análise de restrição usando as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, por PCR usando os *primers* específicos e por sequenciamento com *primers* T7 e os *primers* específicos para o gene.

O vetor pETSUMO utilizado é uma versão modificada produzida no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Figura 11), este vetor foi derivado do vetor pET28a (Novagen) no qual foi adicionado a proteína SUMO (do pETSUMO original Invitrogen), esta permite um aumento na expressão e solubilidade da proteína recombinante. Além disso, a estrutura terciária da proteína SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO-Protease, resultando assim na produção da proteína recombinante nativa. A proteína SUMO é originária da *Saccharomyces cerevisiae*, que faz parte da família da proteína “ubiquitina-like” responsável por regular vários processos celulares. Este vetor contém ainda histidinas na sua extremidade N-terminal, que permite a purificação da proteína recombinante por técnicas de cromatografia de afinidade com resinas de sepharose combinadas com o níquel e a sua identificação usando anticorpos específicos para a cauda de histidinas.

A expressão do gene de interesse é controlada por um promotor bacteriófago T7 forte que foi modificado para conter um “*lac operator*”. Para a expressão do gene, é necessário o suprimento com T7 RNA polimerase para as células, que é fornecido pela *E. coli* BL21 (DE3) que, quando em quantidade suficiente, liga-se ao promotor T7 e transcreve o DNA clonado no vetor pET, produzindo grandes quantidades de mRNA que é então utilizado pela bactéria para produzir grandes quantidades da proteína recombinante (STUDIER *et al.*, 1990).

A bactéria BL21(DE3) é uma linhagem lisogênica muito utilizada no sistema pET de expressão. Ela é obtida pela infecção da *E. coli* BL21 pelo fago DE3, um derivado do fago  $\lambda$ , que contém clonado o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor lacUV5. É capaz de produzir T7 RNA polimerase, quando o promotor lacUV5 for induzido com isopropiltiol- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) adicionado ao meio de cultura.



**Figura 11:** Mapa do vetor. O vetor contém gene de resistência a canamicina (Kan), origem de replicação em bactérias (ori), sequência que codifica proteína repressora do *lacUV5*.

### 12.1 - Transformação em *E. coli* e indução da expressão da proteína recombinante

A linhagem utilizada para expressão da construção resultante pETSUMO-reILTI foi a *E. coli* Rosetta 2 (Novagen), resistente a cloranfenicol, derivada da BL21 (DE3) e designadas para aprimorar a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente vistos em *E. coli*. *E. coli* BL21 é a bactéria mais utilizada para expressão de proteínas, possui baixos níveis de produção de proteases, evitando, assim, a degradação proteolítica da proteína recombinante. Para transformação foi utilizado o protocolo de eletroporação descrito no item 11.5.

Colônia contendo a construção foi crescida em 50 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de canamicina e 100 µg/ml de cloranfenicol durante 16 h a 37 °C em rotação de 250 rpm. Foi determinada a densidade óptica do pré-inóculo a OD<sub>600</sub> nm. A partir dessas medições, alíquotas dessas culturas foram adicionadas em 500 ml de meio LB com os antibióticos ficando a uma OD<sub>600</sub> nm de 0,1. Quando a cultura atingiu OD<sub>600</sub> nm de 0,6, a expressão da proteína de interesse foi induzida mediante a adição de 1 mM de isopropiltiol-β-D-galactosídeo (IPTG). A indução foi realizada a 37 °C sob agitação de 250 rpm durante 4 h.



Ao término desse tempo, o sedimento bacteriano foi coletado por centrifugação a 2.056 x g por 20 min a 4°C. As células foram ressuspensas em 10 ml de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 0,1% de lisozima (p/v) e 2% de sulfato de estreptomicina (p/v) e 150 mM NaCl) e sonicadas para o rompimento das células. Para a lise foram utilizados 4 pulsos de 20 s. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 18.000 x g por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante foi separado. O sobrenadante foi aplicado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para a determinação da presença da proteína solúvel.

## 12.2 - Purificação de reILTI

O vetor pETSUMO possui 6 histidinas no seu N-terminal, isto facilita o processo de purificação da proteína recombinante através da cromatografia de afinidade. Para isso, é utilizada uma resina contendo um íon metálico imobilizado, no caso o níquel. Os anéis imidazólicos das histidinas são capazes de interagir com o níquel, ficando retidas na coluna (PORATH, 1975; ZHAO *et al.*, 1991).

Para purificação, foi utilizada a coluna de afinidade HiTrap Chelating 5 ml (GE), previamente carregada com níquel e equilibrada com o tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM de NaCl e 5 mM imidazol) com fluxo de 1 ml/min. Posteriormente os sobrenadantes da lise foram aplicados. Lavagens sucessivas com o mesmo tampão, mas formando um gradiente de imidazol de 30 - 200 mM foram realizadas até a eluição da proteína. As frações contendo a proteína fusionada (SUMO-reILTI) foram dialisadas com tampão 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 150 mM de NaCl e concentradas. A proteína de fusão concentrada (5 ml) foi incubada com 10 µl da enzima SUMO-Protease (ULP-1) por 4 h, para remoção do peptídeo N-terminal contendo as 6xHis e SUMO. A proteína clivada foi purificada novamente utilizando a coluna HiTrap. O Eluído da coluna foi então purificado com cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina, equilibrada com 100 mM de tampão fosfato, pH 7,6, contendo 100 mM de NaCl. A proteína ILTI foi eluída da coluna utilizando 100 mM de HCl. As frações foram analisadas usando SDS-PAGE, e a concentração de proteína foi determinada utilizando o ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

## **13 - Transformação genética de cana-de-açúcar com gene *ilti-s***

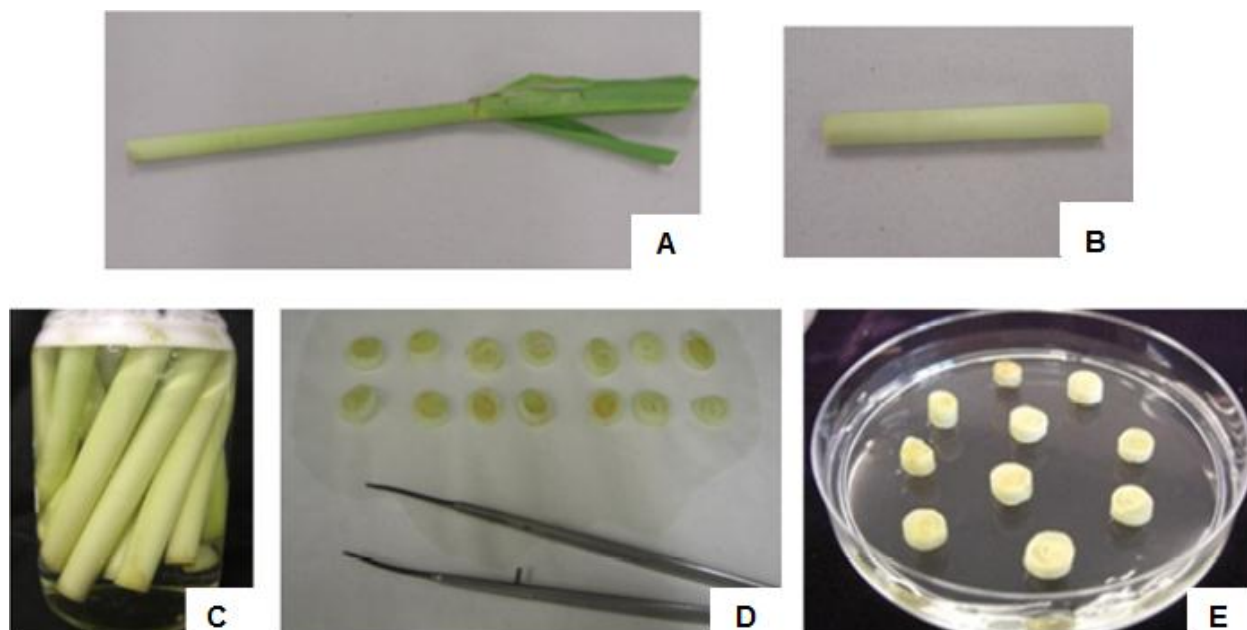
### **13.1 - Material vegetal**

A variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) SP 80-3280 foi utilizada para produção de calos embriogênicos e na transformação genética. Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) do Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” (ESALQ) sob a supervisão da prof. Dra. Helaine Carrer.

### **13.2 - Obtenção de calos**

Plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 80-3280, com idade de 8 a 10 meses foram utilizadas para retirada dos explantes utilizados nos experimentos *in vitro*. A região da planta utilizada para indução de calos é a porção apical do colmo (ponteiro), que contém a região meristemática apical envolvida por folhas jovens enroladas, denominada de palmito. As etapas da metodologia utilizada para obtenção de calos embriogênicos estão na Figura 12. A porção apical (ponteiro) (Figura 12A) foi cortada e duas ou três folhas externas foram removidas e os palmitos (Figura 12B), com aproximadamente 15 cm de comprimento, foram retirados e submetidos à assepsia (Figura 12C). Em seguida, eles foram lavados com etanol 70% sob agitação manual vigorosa, 3 x 30 s. Posteriormente os palmitos foram transferidos para água destilada autoclavada para evitar a desidratação do tecido. Com auxílio de pinças e lâminas de bisturi esterilizadas, os palmitos foram cortados transversalmente em segmentos de 2 a 3 mm de espessura (Figura 12D) e transferidos para solução de ácido cítrico (150 mg/L) para evitar oxidação. Depois de 5 min os discos foliares foram colocados em contato com um papel de filtro esterilizado para retirar o excesso da solução de ácido cítrico e imediatamente transferidos para meio de cultura (Figura 12E) (BOWER *et al.* 1996; BARBOSA, 2010).

Estes explantes foram cultivados em meio de cultura denominado MS3c que é o meio basal MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 5% de água de coco, 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 150 mg/L de ácido cítrico, 30 g/L de sacarose e solidificado com 2,3 g/L de Phytigel (Sigma), pH 5,8. Este material foi incubado em câmara de crescimento no escuro com temperatura de 27±2 °C.



**Figura 12:** Sequência para obtenção de calos embriogênicos *in vitro*. (A) Ponteiro de cana. (B) Segmento da porção apical que contém a região meristemática apical envolvida por folhas jovens enroladas (Palmito). (C) Assepsia dos palmitos em etanol 70%. (D) Cortes transversais de aproximadamente 2 mm de espessura. E: Discos foliares introduzidos *in vitro*. Fotos de Picelli, 2010.

A cada três semanas, os explantes eram repicados e transferidos para meio fresco. Na transferência de meio de cultura, realizaram-se as seleções de calos com aspectos pré-embriogênico e embriogênico (compactos e facilmente destacáveis da estrutura original).

### 13.3 - Construção do vetor com o gene *ilti-s* para transformação genética

Devido às dificuldades para a obtenção da sequência completa do gene *ilti* por meio da utilização de *primers* degenerados, decidiu-se, em paralelo, mandar sintetizar o gene *ilti* tendo em base no uso de códons da cana-de-açúcar. Como a sequência de aminoácidos de ILTI publicada por Macedo e colaboradores (2007) não começa com o aminoácido metionina e segundo informações de outros artigos que demonstraram a presença de peptídeo sinal nos inibidores de tripsina (SONG *et al.* 1993, LI *et al.* 2008), sugerimos que ILTI possui peptídeo sinal. Por este fato, foi inserida a sequência do peptídeo sinal de um inibidor de alfa amilase de cana-de-açúcar no gene *ilti*.

Para amplificação do gene *ilti-s* utilizou-se os *primers* direto ILTI\_BamHI\_F e reverso ILTI\_KpnI\_R (Tabela 3). Os *primers* foram desenhados segundo a sequência completa do gene *ilti-s*. Adicionou-se à extremidade 5' do *primer* direto e do *primer* reverso a sequência referente aos sítios de restrição da enzima *Bam*HI e *Kpn*I, respectivamente, para clonagem do inserto no vetor pGEM-T Easy e subsequentemente no vetor de transformação. A reação de PCR foi realizada conforme o seguinte protocolo: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C; 30 ciclos: 50 s a 94 °C (desnaturação), 40 s a 52 °C (anelamento dos *primers*), 1 min a 72 °C (extensão); extensão final por 7 min a 72 °C. Em seguida o produto de PCR (636 pb) foi ligado ao vetor pGEM-T Easy, e após a seleção dos clones positivos, o fragmento correspondente ao gene *ilti* foi removido por meio das enzimas de restrição (*Bam*HI/*Kpn*I) e ligado no vetor pUBILN, digerido com as enzimas de restrição correspondentes. Para a realização das reações de digestão do plasmídeo e do gene, assim como para a reação de ligação foram seguidas as recomendações dos fabricantes.

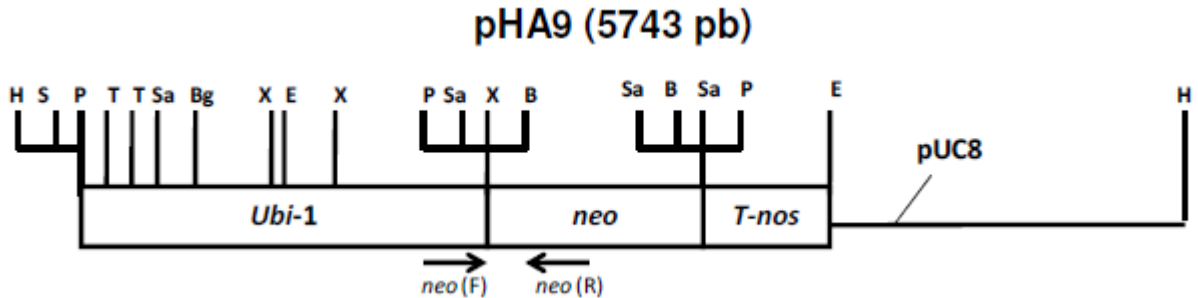
Uma vez realizada a reação de ligação se procedeu à transformação do produto da reação em linhagem de *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) eletrocompetente, utilizando o protocolo descrito no item 11.5. A seleção dos transformantes foi realizada por análise de restrição usando as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, por PCR usando os *primers* específicos e por sequenciamento com *primers* pUBILN e os *primers* específicos para o gene (Tabela 3).

**Tabela 3:** *Primers* utilizados para clonagem e sequenciamento do gene *ilti* no vetor pUBILN. A região sublinhada corresponde ao sítio de restrição.

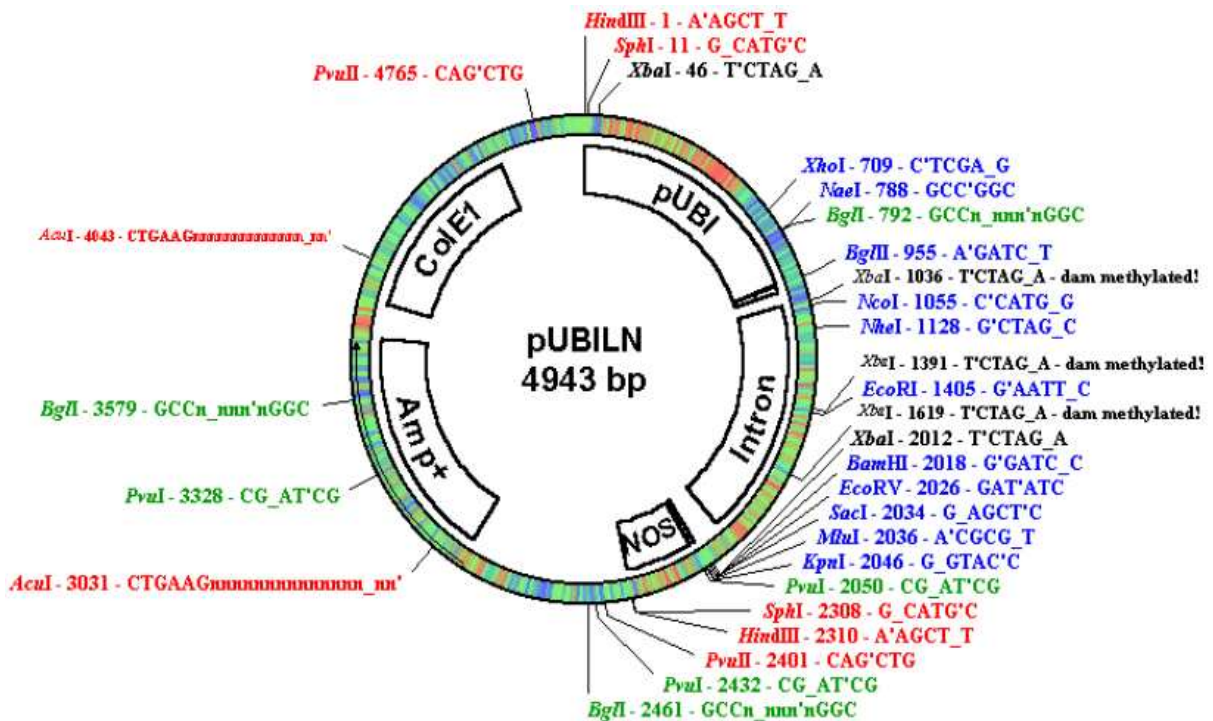
<b>Clonagem e sequenciamento</b>			
<b>Primers</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Sítio de restrição</b>	<b>TA (°C) utilizada na PCR</b>
<b>ILTI_BamHI_F</b> (Direto) Clonagem em pUBILN e sequenciamento	<u>GGATCC</u> CATGAGCATAACCGC	<i>Bam</i> HI	52
<b>ILTI_KpnI_R</b> (Reverso) Clonagem em pUBILN e sequenciamento	<u>GGTACCT</u> CAATTGTCCTTGACC	<i>Kpn</i> I	52
<b>pUBILN</b> (Direto) Sequenciamento	CAGGCTTTACACTTTATGCTTCC	-	60
<b>pUBILN</b> (Reverso) Sequenciamento	CAAATGTTTGAACGATCGGTACC	-	60

A transformação genética de calos embriogênicos foi realizada pelo método da biobalística, por meio da co-transformação dos plasmídeos pHA9 e pUBILN. O plasmídeo pHA9 (Figura 13) (Ubi-1 :: gene *neo* :: terminador *Nos*) contém o cassete de expressão do gene *neo*. Este plasmídeo é utilizado como marcador de seleção, pois confere resistência aos antibióticos aminoglicosídicos como, por exemplo, a canamicina e a geneticina, sendo este último o agente seletivo preferencial para monocotiledôneas, como o caso da cana-de-açúcar (BOWER e BIRCH, 1992; FITCH *et al.*, 1995; FALCO, 2000). O outro plasmídeo utilizado foi o pUBILN (Figura 14) (gentilmente cedido pelo prof. Dr. Marcelo Menossi, da UNICAMP), originário do pRT104 (TÖPFER *et al.*, 1987) e pAHC17 (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996). Esse vetor contém o promotor da ubiquitina de milho (pUBI) e o terminador da nopalina sintase (*nos*), além de um sítio múltiplo de clonagem. Os dois plasmídeos utilizados possuem o gene de interesse sob controle do promotor do gene da ubiquitina do milho, esse promotor constitutivo apresenta altos níveis de expressão em

monocotiledôneas (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996; WEI *et al.*, 2003), além de mostrar-se relativamente estável quanto ao silenciamento dos transgenes, problema frequentemente encontrado em cana-de-açúcar (MUDGE *et al.*, 2009).



**Figura 13:** Esquema representativo do plasmídeo pHA9 que contém o cassete de expressão do gene *neo* (neomicina fosfotransferase), sob o controle do promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*) e o terminador da nopalina sintase (*T-nos*). As setas indicam a posição dos *primers* *neo* (Direto) e *neo* (Reverso). Sítios de restrição: B: *Bam*HI, Bg: *Bgl*II, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, P: *Pst*I, As: *Sal*I, Sp: *Sph*I, T: *Tth*I, X: *Xba*I.



**Figura 14:** Representação esquemática do vetor pUBILN, originário do pAHC17 e pRT104, contendo a região promotora *Ubi-1*, intron, MCS (com vários sítios de restrição para inserção do gene de interesse), terminador NOS, seleção para ampicilina (Amp+) e sítio de replicação do pRT104 (*ColE1*).

### 13.4 - Preparo das partículas

O preparo de partículas e a precipitação do DNA de interesse para bombardeamento foi baseado no método descrito por Melotto-Passarin (2009) e procedeu-se da seguinte maneira:

Inicialmente, realizou-se a assepsia das partículas. Foram pesados 25 mg de partículas de Tungstênio M10 (GTE Sylvania Chemicals/ Metals) para a lavagem em 500 µl de etanol absoluto gelado em um tubo de 1,5 ml. O tubo, contendo as partículas, foi colocado em agitador (vórtex) por 6 min e incubado em banho-maria a 95 °C durante 1 hora. Centrifugou-se a 6.800 x g por 2 s e a fase aquosa foi removida cuidadosamente. Adicionou-se 500 µl de etanol absoluto gelado e as partículas foram sonicadas em aparelho de ultra-som (*Sonics Vibra Cell*) por 15 min com os seguintes parâmetros de operação: amplitude 75%, pulsos de 3 s ligado e 1 s desligado e temperatura ajustada para 20 °C. Centrifugou-se a 6.800 x g por 2 s e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi lavado três vezes com 500 µl de água MilliQ autoclavada e centrifugou-se a 6.800 x g por 2 s, removendo o sobrenadante a cada lavagem. Ressuspendeu-se as partículas em 500 µl de água MilliQ estéril. Para a precipitação do DNA de interesse nas partículas de tungstênio, utilizou-se para seis disparos os componentes de acordo com a seguinte ordem: 50 µl de suspensão das partículas de tungstênio, 10 µg de DNA de interesse (sendo que para co-transformação foram utilizados 5 µg de cada plasmídeo), 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M gelado e 20 µl de espermidina (Sigma) 0,1 M. Esta suspensão foi incubada sob agitação de 300 rpm durante 30 min a 4 °C. Adicionou-se 200 µl de etanol absoluto gelado, agitou-se e centrifugou-se a 10.600 x g por 1 s. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado. Novamente, 200 µl de etanol absoluto foram adicionados e a lavagem e centrifugação se procedeu por mais 3 vezes. O precipitado foi ressuspendido com 30 µl de etanol absoluto gelado. Alíquotas de 5 µl da suspensão de partículas envolvidas por DNA foram depositadas em cada membrana carreadora para realização dos disparos.

O bombardeador ou acelerador de micropartículas utilizado nos disparos para transformação genética foi o modelo PDS 1000/ He *Biolistic Particle Delivery System* (Bio-RAD). Todo material de consumo utilizado no experimento de bombardeamento, como membranas de ruptura e de retenção, telas de retenção e suporte das membranas

carreadoras (BIO-RAD) foram imersos em etanol absoluto por 5 min, secos em papel de filtro autoclavado e mantidos em fluxo laminar para uso em condições assépticas.

As condições de bombardeamento (previamente otimizadas no laboratório CEBTEC – ESALQ) utilizadas no experimento de transformação foram as seguintes:

- distância do alvo: a placa de Petri contendo o tecido alvo foi colocada em prateleira com distância de 11 cm da membrana carreadora.

- pressão de disparo: membrana de ruptura de 1100 psi.

### **13.5 - Transformação de calos embriogênicos via biobalística e seleção dos transformantes**

Baseando-se nas tecnologias de transformação genética existentes para monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, a principal metodologia utilizada é a biobalística (FALCO *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2008; ARVINTH *et al.*, 2010).

Nesse trabalho com cana-de-açúcar, realizou então a transformação genética pelo método de biobalística. Esse método de transformação foi empregado na co-transformação de calos embriogênicos, da variedade SP 80-3280, com o plasmídeo pHA9, contendo o gene *neo*.

O protocolo para transformação pelo método da co-transformação com o plasmídeo pHA9 foi estabelecido com sucesso para o gene *neo* por Falco, (1998). Segundo Falco, 1998, a melhor opção para a seleção de células de plantas monocotiledôneas transformadas com o gene *neo* (*nptII*) é o antibiótico geneticina, uma vez que não interfere no processo de regeneração e pode ser utilizado para a seleção em estágios iniciais. Partindo desse princípio, optou-se por utilizar o antibiótico geneticina no meio de cultura para seleção de células transformadas e regeneração de plantas transgênicas. A utilização do antibiótico canamicina em espécies monocotilêdoneas tem sido desencorajador devido ao alto nível de resistência endógena e pela interferência na regeneração de células transformadas (HAUPTMANN *et al.*, 1988; NEHARA *et al.*, 1994).

Calos embriogênicos no subcultivo R5, que representa a quantidade de repiques para o meio MS3c fresco, foram selecionados e transferidos para meio osmótico, aonde permaneceram por 8 h, sendo 4 h antes do bombardeamento e mais 4 h após a realização



dos disparos. O meio osmótico consiste do meio MS3c suplementado com 0,4 M de manitol e 0,4 M de sorbitol. O tratamento osmótico realizado com manitol e sorbitol (álcoois hexahídricos frequentemente empregados como agente que elevam a pressão osmótica do meio de cultura) tem o efeito fundamental na prevenção de rupturas e vazamento do conteúdo celular, em decorrência da agressão física às células pelo bombardeamento, assim como facilitar a penetração das partículas (FALCO *et al.*, 2000). Danos como necroses (TEE e MAZIAH, 2005) e ausência de formação de novos calos ou embriões somáticos (TADESSE *et al.*, 2003) são alguns dos efeitos adversos encontrados após bombardeamento em calos que não sofreram o tratamento osmótico.

Os calos foram dispostos em um círculo central de 6 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 110 “unidades de calo” (fragmentos de calo com aproximadamente 2 mm<sup>3</sup>) por placa bombardeada, foram realizadas 17 placas.

Transcorrido o período de 4 h após os disparos, os calos foram transferidos do meio osmótico para o meio MS3c. Os calos permaneceram nesse meio de cultura por 3 dias no escuro (período necessário para que os calos bombardeados recuperem-se do estresse induzido pelo meio osmótico e pelo bombardeamento).

Após o período de estabilização (3 dias) dos calos em meio MS3c, estes foram transferidos para meio de regeneração (MRP) contendo 30 mg/L de geneticina filtro-esterilizada. O meio de regeneração consiste do meio basal MS acrescido de 3,72 mg/L de ANA (ácido naftaleno acético), 0,45 mg/L de BAP (benzilaminopurina) (reguladores de crescimento) e 50 mg/L de ácido cítrico, sob 16 h de fotoperíodo. Plantas regeneradas (aproximadamente 30 dias) foram transferidas para meio MS contendo o agente seletivo geneticina (30 mg/L) e a troca para meio seletivo fresco foi realizada a cada 4 semanas. As plantas que enraizaram foram individualizadas e mantidas em meio seletivo até serem analisadas por métodos moleculares.

## **13.6 - Caracterização molecular das plantas transgênicas**

### **13.6.1 - Extração do DNA total e análise por PCR**

Folhas de 54 plantas de cana-de-açúcar regeneradas em meio de cultura contendo 30 mg/L de geneticina foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em

freezer -80 °C para extração de DNA total. O método de extração utilizado foi baseado no método CTAB desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), protocolo descrito no item 11.1. Após extração, avaliou-se a qualidade e a concentração do DNA obtido em gel de Agarose 1,0%.

Cerca de 50 ng de DNA foi utilizado nas reações de PCR para confirmação da inserção do gene *ilti-s* no genoma.

A reação de PCR para detecção do transgene foi realizada conforme o protocolo: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos: 50 s a 94 °C para desnaturação, 40 s a 57 °C para anelamento dos *primers* e 1 min a 72 °C para extensão; extensão final a 72 °C por 7 min. Os *primers* utilizados na detecção do transgene foram: direto ILTI\_BamHI\_F e reverso ILTI\_KpnI\_R (Tabela 3). O produto da amplificação possui um tamanho de 636 pb. Para validação dos resultados foram utilizados controles (positivo e negativo). Como controle negativo das reações utilizou-se a água e plantas de cana-de-açúcar não transformadas (selvagens). Para o controle positivo, aplicou-se o plasmídeo pUBILN ligado com o gene. As reações foram analisadas em gel de Agarose 1,0%.

### **13.6.2 - Extração de RNA total e síntese de cDNA**

Folhas de 6 plantas dentre as 22 plantas de cana-de-açúcar transgênicas contendo o gene de interesse foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até serem utilizadas para a extração do RNA. O RNA total foi extraído pelo método do Trizol *Reagent* (Invitrogen), de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante. O RNA isolado foi analisado em gel de agarose 1,0% para verificação da qualidade do RNA obtido após extração. A quantificação de RNA foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop (ThermoScientific). 1 µg de RNA total foi tratado com *Amplification grade* DNase I (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, com a intenção de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico.

O RNA total tratado com DNase I foi utilizado para a síntese do cDNA total foliar para cada amostra. Utilizou-se a enzima SuperScript® II RT, tendo o pdn6 como *primer* da reação.

### **13.7 – Avaliação do efeito das plantas transgênicas de cana-de-açúcar sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis***

Foram selecionadas quatro plantas de cana-de-açúcar transgênicas, plantadas em vasos individuais e cultivadas em estufa, propagadas de eventos transgênicos independentes para realização dos experimentos com o inseto-praga. Para cada ensaio, foram coletadas 3 cm de folhas de cana-de-açúcar com 3 meses de plantio, estas foram colocadas em copinhos plásticos sob um papel filtro umedecido, para manter os fragmentos de folhas úmidos, e mantidos em condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz e 18 h de escuro) e temperatura (27 °C). Cada tratamento foi composto por quinze repetições contendo entre 6 a 8 larvas neonatas de *D. saccharalis* ( $90 \leq n \leq 120$ ). As larvas foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Entomologia, ESALq, Piracicaba-SP. O controle experimental utilizou larvas alimentadas com plantas não transformadas. As larvas que morreram durante os quatro primeiros dias foram substituídas por outras para diminuir a possibilidade de falsos positivos (considerar larvas mortas por manipulação como produto de efeito da alimentação com folhas transgênicas). As folhas foram trocadas a cada 2 dias. No vigésimo segundo dia de inoculação as larvas foram pesadas. Neste ensaio avaliamos o crescimento do inseto em termos de peso e sobrevivência. No final do experimento (24 dias), para investigar o efeito das plantas transgênicas sobre a atividade enzimática das larvas de *D. saccharalis*, o intestino médio das larvas, alimentadas com folhas de cana transgênica e não transformadas, foi removido utilizando o protocolo descrito no item 4 e as enzimas presentes no homogenato de intestino médio foram utilizadas no ensaio enzimático, seguindo o protocolo descrito no item 6.

## **14 - Transformação genética de *Nicotiana tabacum* com os genes *ilti* e *ilti-s***

### **14.1 - Material vegetal**

Plantas jovens de tabaco (*Nicotiana tabacum* L., cultivar SR1) (Figura 15), mantidas em cultivo *in vitro* para se obter uma maior uniformidade dos explantes sob condições assépticas, foram utilizadas nos experimentos de transformação genética com gene *ilti* e *ilti-s* de *I. laurina* clonado no vetor binário pCAMBIA2301. A técnica utilizada para este

propósito foi a de infecção de discos foliares via *Agrobacterium tumefaciens* descrita por Horsch e colaboradores (1985).



**Figura 15:** Planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1 *in vitro*.

#### **14.2 - Preparo de células termocompetentes (*A. tumefaciens*)**

Para o preparo de células de *A. tumefaciens* termocompetentes, foi realizado um pré-inóculo em meio LB, na presença do antibiótico gentamicina (50 µg/ml) para a cepa GV3101 (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michel Vincentz, CBMEG – Unicamp). O meio foi inoculado com uma colônia de bactérias retirada de meio sólido. Esse pré-inóculo após incubação de 16 h (28 °C em 150 rpm) foi diluído 25x em meio LB e incubado em estufa com agitação (28 °C em 150 rpm) por cerca de 16 h. A absortividade em 600 nm ( $A_{600}$ ) foi monitorada até a cultura atingir a  $A_{600}$  entre 0,5 e 1,0, em seguida o inóculo foi retirado da incubadora e levado ao banho de gelo por 15 min. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 3000 x g, 4 °C por 15 min, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em solução de CaCl<sub>2</sub> 20 mM e glicerol 15% estéril (gelada). A suspensão de células foi separada em alíquotas de 100 µl e armazenadas a -80 °C.

### 14.3 - Construção do vetor com o gene *ilti* e com o gene *ilti-s* para transformação genética

Para amplificação do gene *ilti* utilizou-se os *primers* direto ILTI\_SacI\_F e reverso ILTI\_BamHI\_R (Tabela 4). A amplificação do gene *ilti-s* foi realizada utilizando os *primers* direto ILTI\_KpnI\_F e o mesmo *primer* reverso (ILTI\_BamHI\_R) dada a similaridade das sequências (Tabela 4). Os *primers* foram desenhados segundo a sequência completa do gene *ilti* e do gene *ilti-s*. A Tabela 4 apresenta também os sítios de restrição adicionados aos *primers* para a clonagem dos genes *ilti* e *ilti-s* no vetor pGEM-T Easy e subsequentemente no vetor de transformação assim como o tamanho esperado do fragmento amplificado em cada caso. A reação de PCR para os genes foi realizada conforme o seguinte protocolo: desnaturação inicial por 3 min a 94 °C; 30 ciclos: 50 s a 94 °C (desnaturação), 50 s a 53 °C (anelamento dos *primers*), 1 min a 72 °C (extensão); extensão final por 7 min a 72 °C. Cada fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy e posteriormente retirado mediante digestão com enzimas de restrição adicionadas nos *primers*. Em seguida, os genes foram clonados no vetor pRT104 previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. As técnicas básicas para clonagem dos genes foram realizadas seguindo as recomendações dos fabricantes das enzimas e kits utilizados. Uma vez realizada a reação de ligação se procedeu à transformação dos produtos das reações em linhagem de *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) eletrocompetente, utilizando o protocolo descrito no item 11.5. A seleção dos transformantes foi realizada por análise de restrição usando as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, por PCR usando os *primers* específicos e por sequenciamento com *primers* específicos para cada um dos genes (Tabela 4).

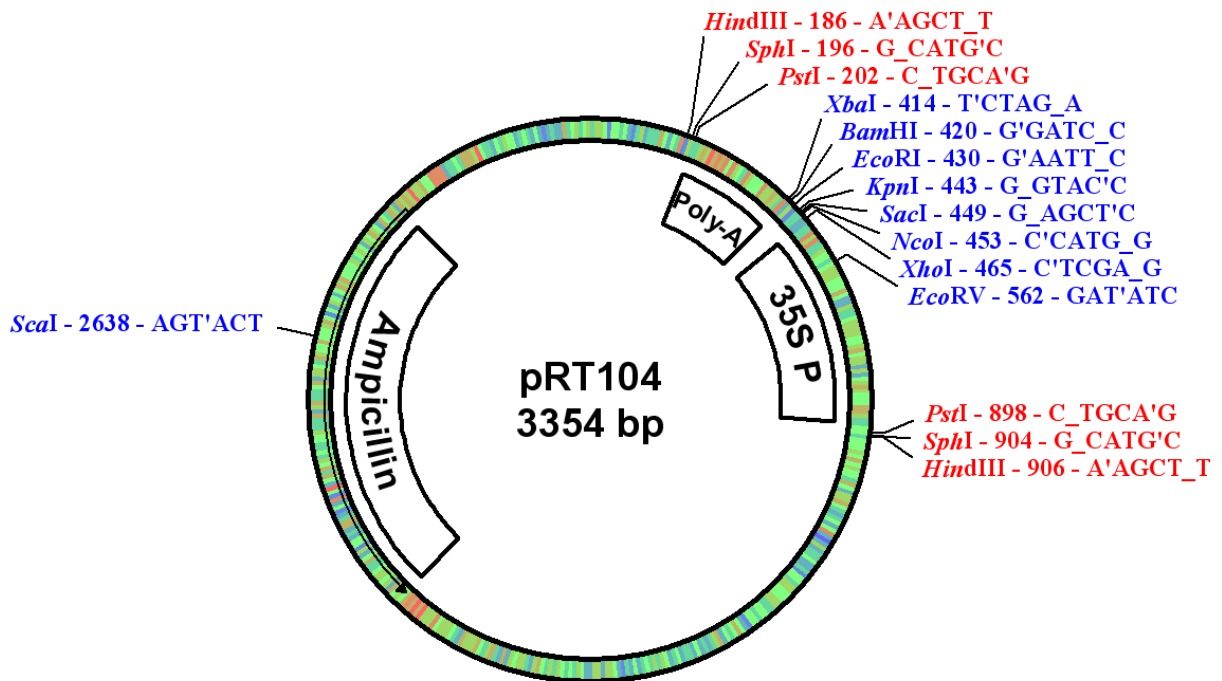
**Tabela 4:** *Primers* utilizados para clonagem e sequenciamento do gene *ilti* e do gene *ilti-s* no vetor pRT104. A região sublinhada corresponde ao sítio de restrição.

<b>Clonagem e sequenciamento</b>				
<b>Primers</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Sítio de restrição</b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>	<b>TA (°C) utilizada na PCR</b>
<b>ILTI_SacI_F</b> (Direto) Clonagem do gene <i>ilti</i> em pRT104 e sequenciamento	<u>GAGCTCATGGAGGTGGTGG</u>	<i>SacI</i>	552	53
<b>ILTI_KpnI_F</b> (Direto) Clonagem do gene <i>ilti-s</i> em pRT104 e sequenciamento	<u>GGTACCATGAGCATACCGC</u>	<i>KpnI</i>	636	53
<b>ILTI_BamHI_R</b> (Reverso) (Clonagem em pRT104 e sequenciamento)	<u>GGATCCTCAATTGTCCTTGAC</u>	<i>BamHI</i>	-	53

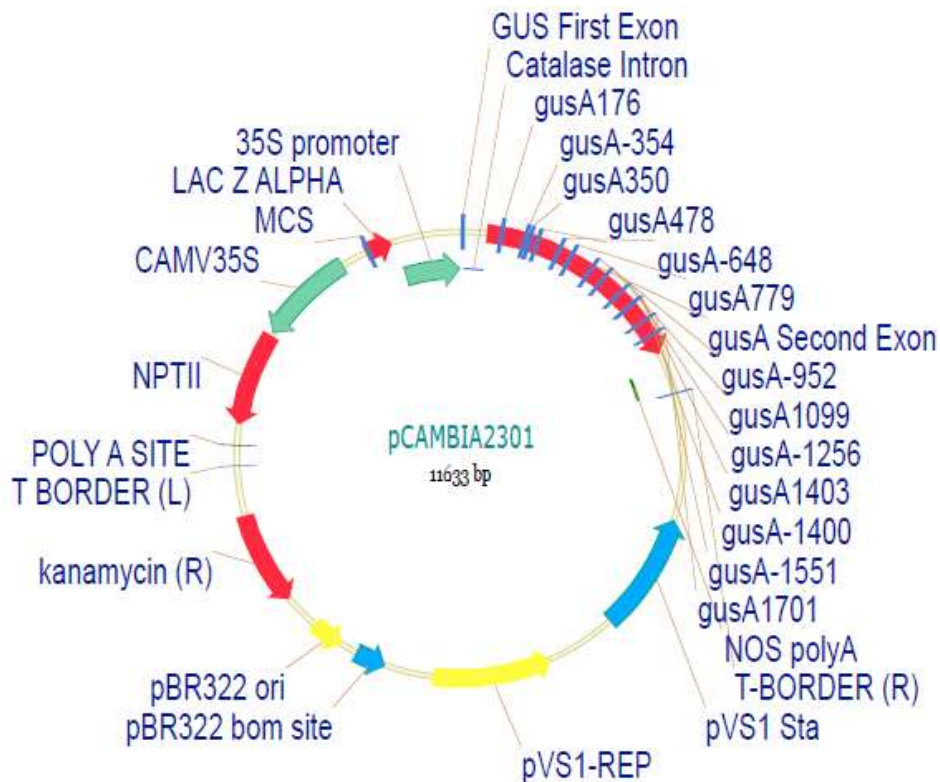
O vetor pRT104 possui a sequência do promotor 35S e sinal de poliadenilação provenientes do vírus do mosaico da couve flor (CaMV 35S e CaMV poliA), com múltiplos sítios de clonagem localizados entre estas regiões (Figura 16). O 35S é um promotor constitutivo, amplamente utilizado em engenharia genética. Confere expressão constitutiva de genes heterólogos na maioria dos vegetais, com altos níveis de expressão em dicotiledôneas (BENFEY E CHUA, 1990).

A estratégia baseou-se na subclonagem em vetor pRT104 para inserção da sequência promotora e poliA. Posteriormente, o cassete contendo a sequência promotora 35S, o gene de interesse e a calda poliA (35S P :: gene:: Poly-A) foi removido usando as enzimas adequadas para a clonagem no vetor binário pCAMBIA2301: *PstI* no caso de *ilti* e *HindIII* para *ilti-s* (Figura 17). Estes fragmentos foram ligados no vetor pCAMBIA2301 previamente digerido com as enzimas de restrição correspondentes. As técnicas básicas

para clonagem dos genes foram realizadas seguindo as recomendações dos fabricantes das enzimas utilizadas. Uma vez realizada a reação de ligação se procedeu à transformação dos produtos das reações em linhagem de *E.coli* (DH5α) eletrocompetente, utilizando o protocolo descrito no item 11.5. A seleção dos transformantes foi realizada por análise de restrição usando as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, por PCR usando os *primers* específicos e por sequenciamento com *primers* específicos para cada um dos genes (Tabela 4). Os clones recombinantes foram posteriormente transformados em *Agrobacterium*.



**Figura 16:** Mapa do vetor pRT104. Extraído de Töpfer *et al*, 1987. O vetor contém gene de resistência a ampicilina (Amp), sequência promotora 35S (35S P) e sinal de poliadenilação (poly-A), com múltiplos sítios de clonagem entre estas regiões e flanqueando as mesmas.



**Figura 17:** Mapa do vetor pCAMBIA2301. Extraído de <<http://www.cambia.org>>. O vetor contém origem de replicação em bactérias (pBR322 ori), região de replicação pVS1 (pVS1-REP) e estabilidade pVS1 (pVS1 Sta) para replicação em *Agrobacterium*. As bordas esquerda (T-Border(L)) e direita (T-Border(R)) compreendem a porção de DNA que será transferida e integrada no genoma da planta. Também possui gene de resistência a canamicina em bactérias (kanamycin (R)) e plantas (NPTII), sendo o último controlado por CAMV35S. No lacZ possui múltiplos sítios de clonagem.

#### 14.4 - Transformação de células termocompetentes (*A. tumefaciens*) e seleção dos transformantes

Para a transformação de *A. tumefaciens* cepa GV0131, o plasmídeo de interesse (pCAMBIA2301-*ilti* ou pCAMBIA2301-*ilti-s*) foi adicionado a um tubo contendo 100 µl de suspensão de bactérias competentes, e foi levado a incubação no gelo por 30 min. Em seguida, as células foram incubadas em nitrogênio líquido até total congelamento e imediatamente transferidas para incubação a 37 °C por 5 min. Decorrido este tempo, foi adicionado 1 ml de meio LB e este material foi incubado por 2 h a 28 °C. Após o crescimento, cerca de 100 µl da suspensão de células foi plaqueado em LB ágar contendo os antibióticos canamicina (50 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml) e incubado a 28 °C. A



seleção dos transformantes foi realizada por PCR e por sequenciamento usando nos dois casos *primers* específicos para os genes.

#### **14.5 - Preparo do inóculo da linhagem GV0131 de *A. tumefaciens***

Uma colônia isolada de um clone da linhagem GV0131 recombinante, portadora do gene *ilti* e outra portadora do gene *ilti-s*, foram transferidas em separado, para frascos Erlenmeyer contendo 10 ml de meio LB líquido acrescido de canamicina (50 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml), que foram mantidos a 28 °C por 24 h, sob agitação constante (150 rpm). Após esse período, alíquotas de 150 µl foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 500 ml de meio LB líquido acrescido de canamicina (50 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml). As suspensões bacterianas foram mantidas a 28 °C por 24 h sob agitação constante (150 rpm) até atingirem a densidade ótica a 600 nm de 0,8. As suspensões foram imediatamente centrifugadas (2.900 x g) durante 5 min e os *pellets* bacterianos, ressuspendidos em 40 ml de NaCl 0,85%.

#### **14.6 - Transformação de discos foliares de tabaco**

Para os experimentos de transformação genética de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens* foram coletadas folhas de plantas de tabaco jovens cultivadas em câmara de crescimento, sob condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz e 8 h de escuro) e temperatura (25 °C). Em fluxo laminar, as folhas foram cortadas em discos foliares de 1 cm de diâmetro com auxílio de um cortador metálico, estes foram mergulhados na solução de *Agrobacterium* previamente centrifugada e ressuspendida em NaCl e foram mantidos por 1 min. Após a infecção, os discos foliares foram transferidos para papel de filtro estéril para retirada do excesso de inóculo, antes de serem transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo MS sólido acrescido de 1 mg/L de tiamina, 1 mg/L de BAP (citocinina), 0,1 mg/L ANA (auxina) e 100 mg/L de inositol. Os discos foliares foram então mantidos nesse meio de cocultivo a 26 °C, no escuro. Após 72 h, foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS acrescido de 500 mg/L de timentin e 50 µg/ml de canamicina. Os discos foliares foram mantidos nesse meio até a formação de brotos, que foram então transferidos após alongamento para novo meio MS desprovido de fitorreguladores, de forma a estimular a formação de raízes. Os brotos que enraizaram foram transferidos para vasos, contendo substrato (*Plantmax*) e vermiculita em proporção

1:1. Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento sob condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz e 8 h de escuro) e temperatura (25 °C).

## **14.7 - Análise das plantas de tabaco transformadas**

### **14.7.1 - Extração do DNA total e análise por PCR**

Discos foliares de 3 cm de diâmetro das plantas transformadas foram coletados, macerados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C para extração de DNA total. O método de extração utilizado foi baseado no método CTAB desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), protocolo descrito no item 11.1. Após extração, avaliou-se a qualidade e a concentração do DNA obtido em gel de agarose 1,0%.

Cerca de 50 ng de DNA foi utilizado nas reações de PCR para confirmação da inserção do gene *ilti* e do gene *ilti-s* no genoma. A detecção dos transgenes foi realizada por PCR conforme o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 30 ciclos: 50 s a 94 °C para desnaturação, 50 s a 60 °C (*ilti*) e 57 °C (*ilti-s*) para anelamento dos *primers* e 1 min a 72 °C para extensão; extensão final a 72 °C por 7 min. Os *primers* utilizados na detecção dos transgenes *ilti* e *ilti-s* assim como os tamanhos dos fragmentos esperados estão apresentados na Tabela 4. Para validação dos resultados foram utilizados como controle das reações a água e plantas de tabaco não transformadas (selvagens). As reações foram analisadas em gel de agarose 1,0%.

## **14.8 - Avaliação do efeito das plantas transgênicas de tabaco sobre o desenvolvimento de *H. virescens***

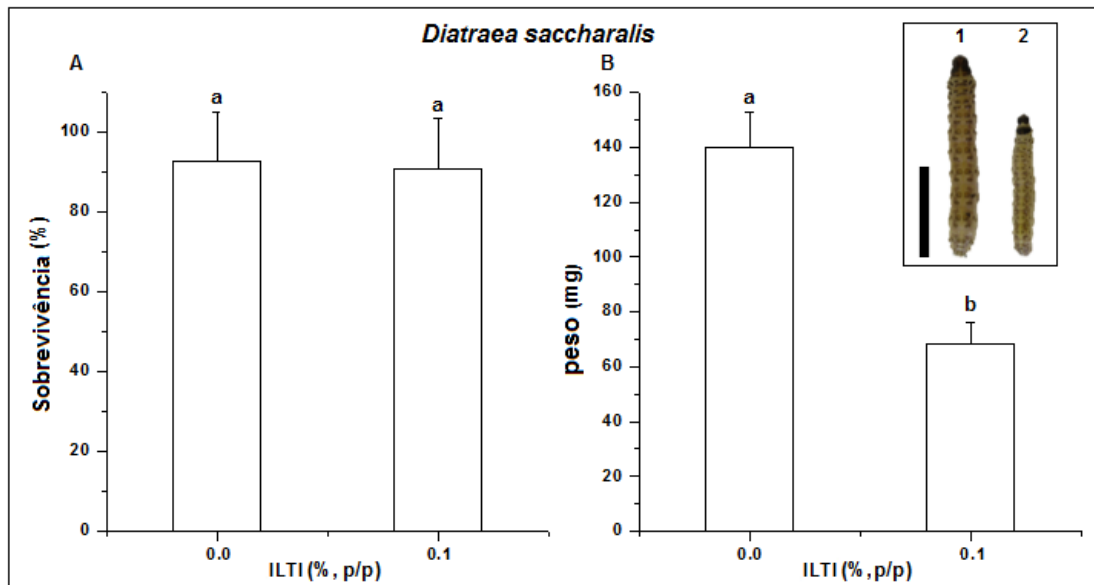
Foram selecionadas três plantas de tabaco transgênicas: uma transformada com o gene *ilti* que foi denominada G1; e duas plantas transformadas com o gene *ilti-s* (S1 e S2). As plantas foram plantadas em vasos individuais e cultivadas em estufa, propagadas de eventos transgênicos independentes para realização dos experimentos com o inseto-praga. Para cada ensaio, foram coletadas 3 cm de folhas de tabaco com 1 mês de plantio. Estas foram colocadas em copinhos plásticos sob um papel filtro umedecido e mantidas em condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz e 18 h de escuro). Cada tratamento foi composto por trinta repetições contendo uma larva neonata de *H. virescens* (n= 30). As larvas de *H. virescens* foram obtidas na empresa Bug Agentes Biológicos (Piracicaba, SP).

O controle experimental utilizou larvas alimentadas com plantas não transformadas. As larvas que morreram durante os quatro primeiros dias foram substituídas por outras para diminuir a possibilidade de falsos positivos (considerar larvas mortas por manipulação como produto de efeito da alimentação com folhas transgênicas). As folhas foram trocadas a cada 2 dias ou diariamente se necessário. No décimo terceiro dia de inoculação as larvas foram pesadas. Neste ensaio avaliamos o crescimento do inseto em termos de peso e sobrevivência. No final do experimento (16 dias), para investigar o efeito das plantas transgênicas sobre a atividade enzimática das larvas de *H. virescens*, o intestino médio das larvas, alimentadas com folhas de tabaco transgênicas e não transformadas, foi removido utilizando o protocolo descrito no item 4. As enzimas presentes no homogenato de intestino médio foram utilizadas no ensaio enzimático, seguindo o protocolo descrito no item 6.

## VI - RESULTADOS

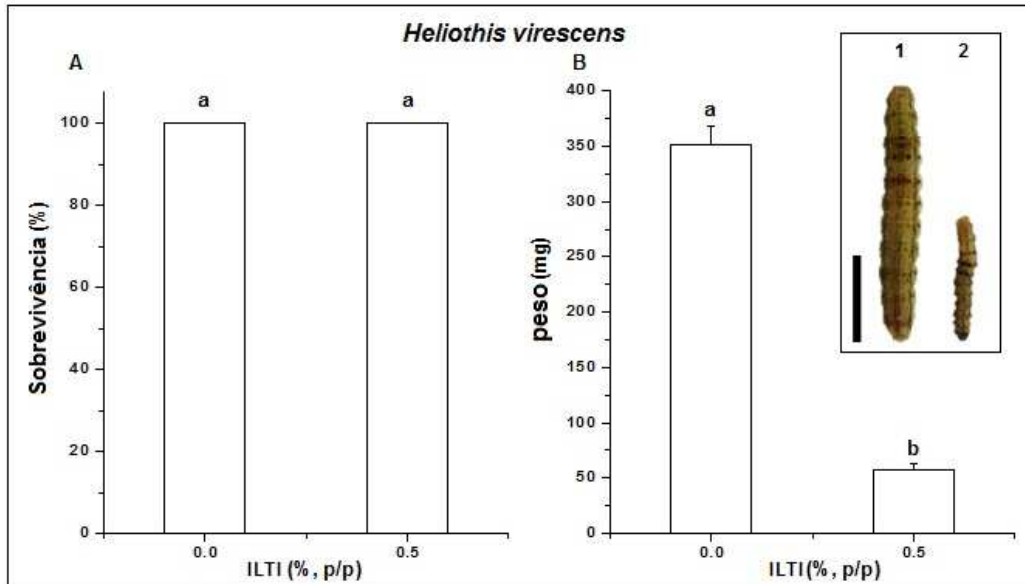
### 1 - Efeito antimetabólico de ILTI sobre o desenvolvimento larval de *D. saccharalis* e *H. virescens*

O efeito de ILTI sobre o desenvolvimento de ambas as espécies de insetos foi avaliado através de sua incorporação em dieta artificial nas concentrações de 0,1% para *D. saccharalis* e 0,5% para *H. virescens*. O número de indivíduos e o peso médio das larvas de quarto ínstar foram determinados. O efeito antimetabólico de ILTI no crescimento das larvas de *D. saccharalis* está representado na Figura 18A e B. ILTI não apresentou efeito significativo na sobrevivência larval (Figura 18A), no entanto, quando analisamos o efeito do inibidor sobre o peso médio das larvas, foi verificado um decréscimo no peso médio larval de aproximadamente 51% (Figura 18B). A foto inserida na Figura 18B ilustra o efeito de ILTI na redução do peso médio das larvas de *D. saccharalis*.



**Figura 18:** Efeito de ILTI sobre as larvas de 20 dias de *D. saccharalis* alimentadas com dieta controle e dieta contendo ILTI 0,1%. (A) Número de larvas sobreviventes. (B) Peso médio larval. Foto inserida ilustra a variação no tamanho das larvas de quarto ínstar alimentadas em dieta controle (1) ou dieta contendo ILTI 0,1% (2). Barra = 1 cm. Cada valor representa a média  $\pm$  SD de  $n = 40$ . Letras idênticas indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

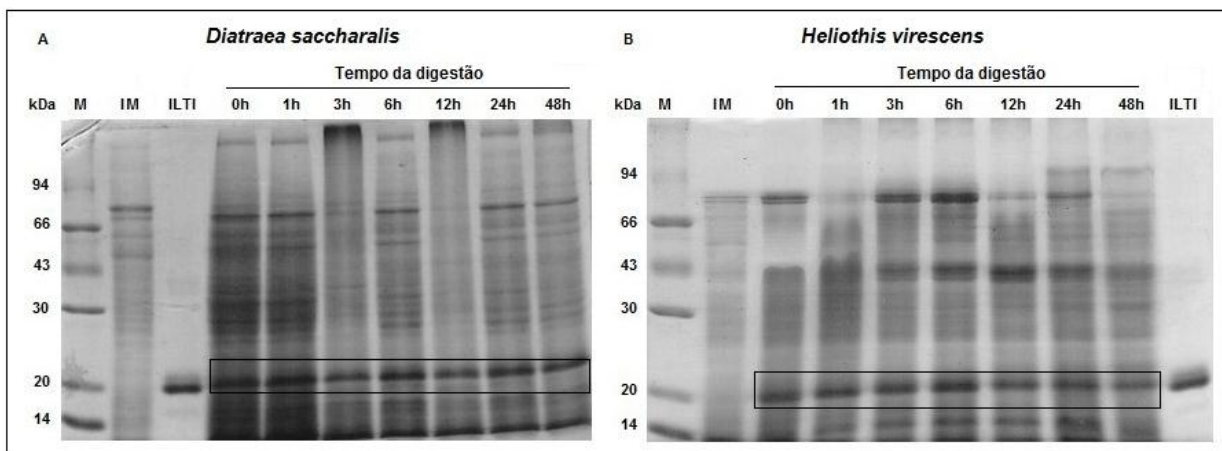
Resultados semelhantes foram observados para *H. virescens*. Não houve diferença na sobrevivência larval (Figura 19A), enquanto que uma redução de 84% no peso médio foi observada (Figura 19B). O gráfico inserido na figura 19B mostra a variação no tamanho das larvas de *H. virescens* alimentadas em dieta controle e dieta contendo ILTI.



**Figura 19:** Efeito de ILTI no desenvolvimento das larvas de *H. virescens* alimentadas com dieta controle e dieta contendo ILTI 0,5%. (A) Sobrevivência larval. (B) Peso médio. Foto inserida ilustra a variação no tamanho das larvas de quarto ínstar alimentadas em dieta controle (1) ou dieta contendo ILTI 0,5% (2). Barra de 1 cm. Cada valor representa a média  $\pm$  SD de  $n = 20$ . Letras diferentes indicam que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

## 2 - Digestibilidade *in vitro* de ILTI por enzimas digestivas de *D. saccharalis* e *H. virescens*

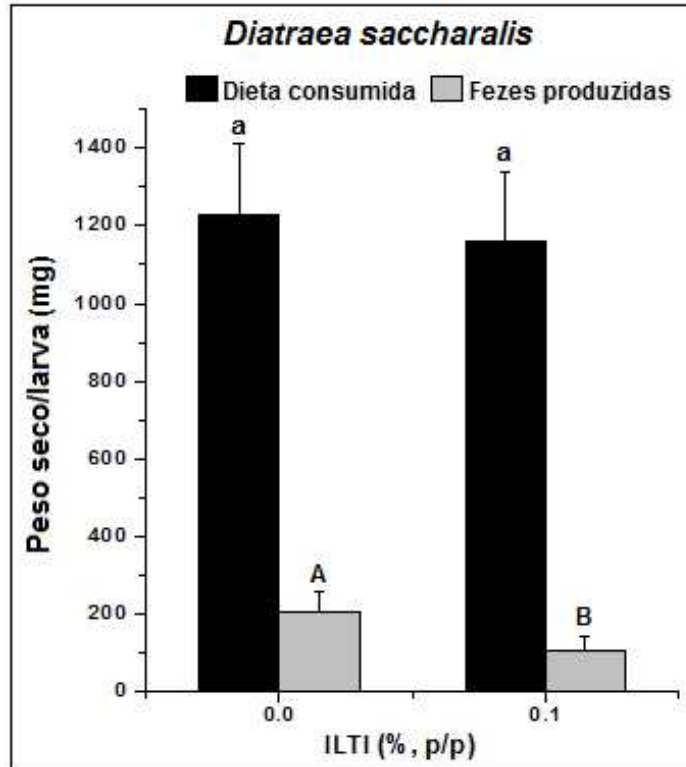
A susceptibilidade de ILTI a degradação pelas enzimas do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens* foi avaliada pela incubação do inibidor com as enzimas presentes no homogenato de intestino médio, seguido por análise em SDS-PAGE. Os perfis das bandas de proteína são apresentados na Figura 20A e B. Através da análise do gel, foi verificado que até 48 h ILTI não sofreu digestão enzimática pelas proteinases.



**Figura 20:** Eletroforese em SDS-PAGE do ensaio de digestibilidade *in vitro* de ILTI por proteinases do homogenato de intestino médio (IM) de *D. saccharalis* (A) e *H. virescens* (B). Números adjacentes ao gel indicam o peso do marcador molecular (M) Low Range (BIO-RAD) em kDa. A banda de ILTI está indicada na caixa.

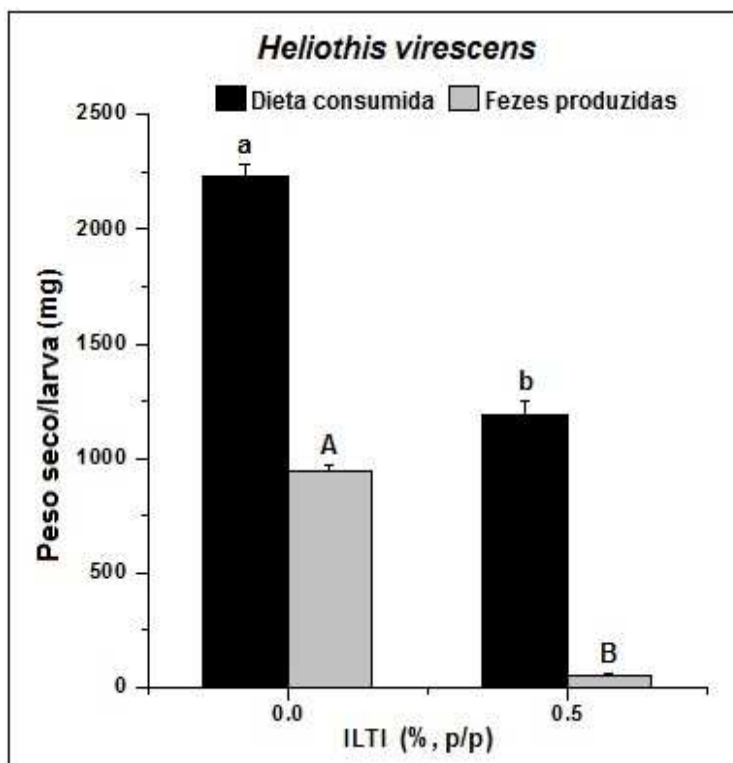
### 3 - Consumo e utilização de alimento

A Figura 21 mostra o efeito de ILTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *D. saccharalis*. Apesar de ILTI não ter causado efeito significativo no consumo da dieta quando incorporado a 0,1%, a produção de fezes por larva sofreu uma diminuição de 48% quando comparada à produção de fezes das larvas alimentadas com dieta controle.



**Figura 21:** Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *D. saccharalis* alimentadas com ILTI. Dieta consumida por larva e fezes produzidas por larva foram mensuradas. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

Para as larvas de *H. virescens* alimentadas com ILTI 0,5%, verificamos uma diminuição na dieta consumida e na produção fecal de 53,6% e 94,8%, respectivamente, quando comparada com o grupo controle (Figura 22).



**Figura 22:** Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *H. virescens* alimentadas com ILTI. Dieta consumida por larva e fezes produzidas por larva foram mensuradas. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

As análises nutricionais mostram que ILTI influencia no metabolismo das larvas de *D. saccharalis* (Tabela 5) e de *H. virescens* (Tabela 6) quando comparadas às larvas alimentadas com dieta controle. Para as larvas de *D. saccharalis*, houve uma diminuição de 49,3% no ECD, que é a quantidade de alimento efetivamente absorvido. Houve um aumento de 7,6% no custo metabólico (CM), mas nenhuma alteração significativa foi observada no ECI e AD.



**Tabela 5****Índices nutricionais das larvas de *D. saccharalis* alimentadas em dietas artificiais contendo 0.1% de IL TI e dieta controle**

<b>Índices nutricionais (média ± SD)</b>				
<b>Tratamento (%)</b>	<b>ECI (%)</b>	<b>ECD (%)</b>	<b>AD (%)</b>	<b>CM (%)</b>
<b>0.0</b>	<b>10.6 ± 2.5 a</b>	<b>13.6 ± 3.4 a</b>	<b>86.1 ± 5.2 a</b>	<b>86.4 ± 3.4 a</b>
<b>0.1</b>	<b>6.3 ± 1.5 a</b>	<b>6.9 ± 1.5 b</b>	<b>91.0 ± 2.9 a</b>	<b>93.0 ± 1.5 b</b>

Médias dentro de uma coluna seguida pela mesma letra não são diferentes significativamente,  $p < 0.05$ ; com base no teste de Tukey.

Todos os parâmetros nutricionais foram alterados para larvas de *H. virescens*. Houve uma diminuição no ECI, que representa o ganho de biomassa em relação à quantidade de alimento ingerido, e no ECD de 68% e 80%, respectivamente, enquanto que a AD, que é a eficiência de assimilação do alimento ingerido, e o CM aumentou em 61% e 29%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle.

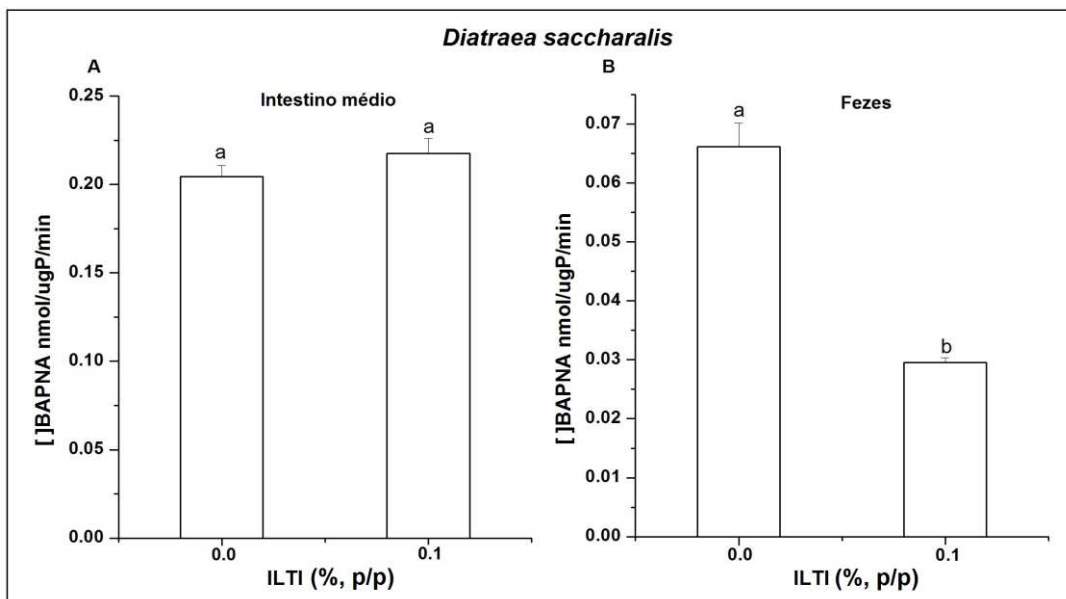
**Tabela 6****Índices nutricionais das larvas de *H. virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo 0.5% de IL TI e dieta controle**

<b>Índices nutricionais (média ± SD)</b>				
<b>Tratamento (%)</b>	<b>ECI (%)</b>	<b>ECD (%)</b>	<b>AD (%)</b>	<b>CM (%)</b>
<b>0.0</b>	<b>15.9 ± 2.1 a</b>	<b>26.7 ± 2.6 a</b>	<b>59.9 ± 7.4 a</b>	<b>73.3 ± 2.6 a</b>
<b>0.5</b>	<b>5.0 ± 3.7 b</b>	<b>5.3 ± 4.1 b</b>	<b>96.2 ± 3.3 b</b>	<b>94.7 ± 4.1 b</b>

Médias dentro de uma coluna seguida pela mesma letra não são diferentes significativamente,  $p < 0.05$ ; com base no teste de Tukey.

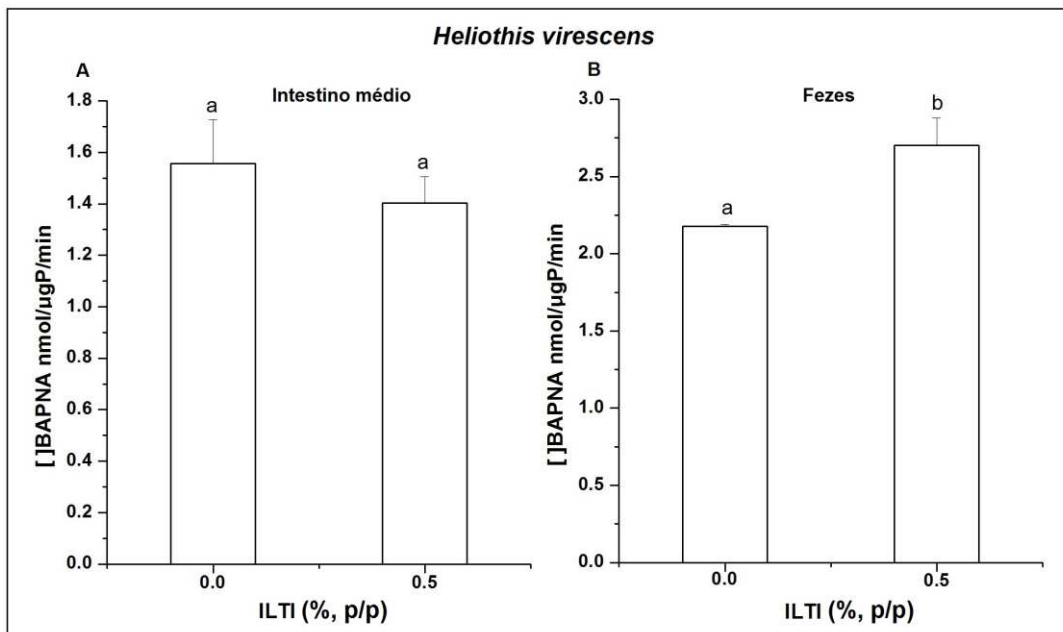
#### 4 - Ação de ILTI na atividade enzimática de *D. saccharalis* e *H. virescens*

Ensaio enzimático foram realizados para avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo, já que foi observado um efeito negativo no desenvolvimento larval. As enzimas presentes no intestino médio e nas fezes das larvas alimentadas com dieta controle e com ILTI tiveram sua atividade avaliada através da hidrólise do substrato BAPNA. O consumo de uma dieta contendo ILTI não alterou a atividade trípica no intestino das larvas de *D. saccharalis* (Figura 23A), mas ocasionou uma diminuição significativa de 55% na atividade trípica fecal (Figura 23B), sugerindo que ILTI está afetando o metabolismo deste inseto.



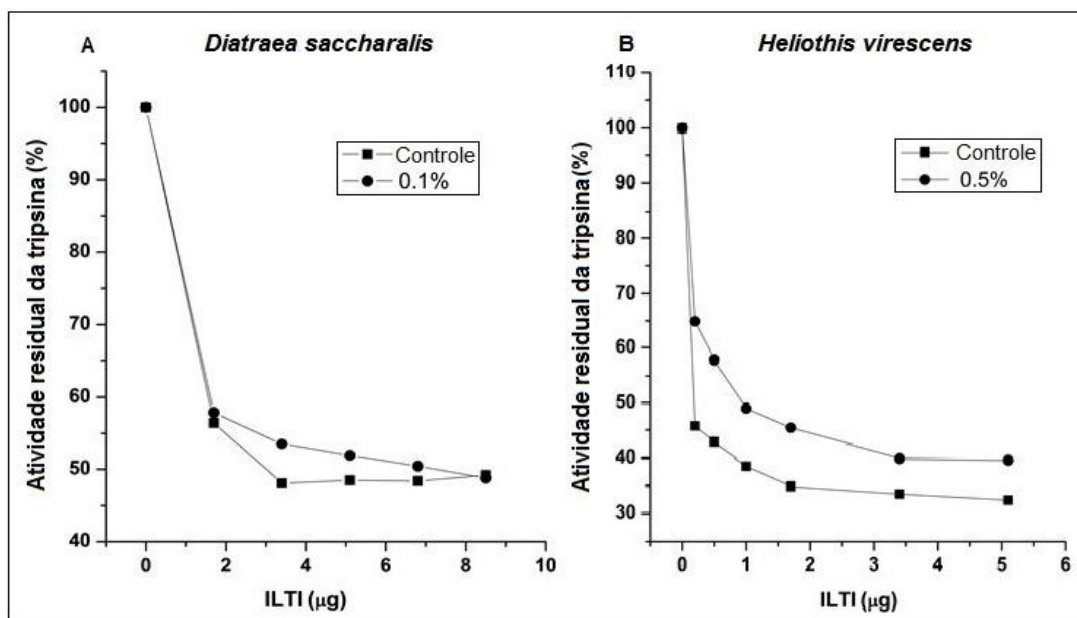
**Figura 23:** Resposta das proteinases de *D. saccharalis* à ingestão de ILTI 0,1%. (A) Atividade trípica das enzimas do IM; (B) Atividade trípica das enzimas presentes nas fezes. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

A Figura 24A mostra que não houve diferença significativa na atividade das enzimas presentes no IM das larvas de *H. virescens* alimentadas com ILTI 0,5%, e a atividade trípica nas fezes aumentou aproximadamente 24% após a ingestão de ILTI (Figura 24B).



**Figura 24:** Resposta das proteinases de *H. virescens* à ingestão de ILTI 0,5%. (A) Atividade trípica das enzimas do IM; (B) Atividade trípica das enzimas presentes nas fezes. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

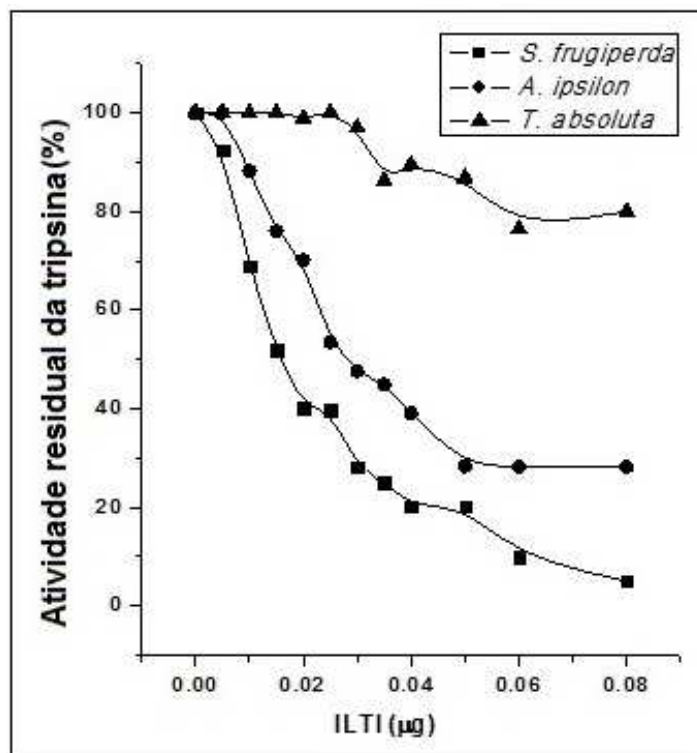
Para avaliar a sensibilidade da tripsina de larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo ILTI, ensaios *in vitro* foram realizados incubando concentrações crescentes de ILTI com o homogenato de IM de larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens* e a atividade trípica residual foi analisada através da hidrólise de BAPNA. As Figuras 25A e B mostram que o perfil de inibição da tripsina das larvas alimentadas com ILTI foi semelhante com o das larvas controle. As proteinases dos insetos alimentados com ILTI continuam sensíveis à ação do inibidor incubado no ensaio, sugerindo que nenhuma nova proteinase resistente a ILTI está sendo induzida.



**Figura 25:** Inibição por ILTI das tripsinas do IM de larvas de *D. saccharalis* (A) e *H. virescens* (B) alimentadas em dieta artificial. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As barras do desvio padrão (coeficiente de variação <20%) foram omitidas para maior clareza.

## 5 - Estudo da atividade biológica de ILTI frente às proteinases de diferentes insetos-praga

A Figura 26 mostra a especificidade de ILTI em relação à atividade trípica do IM de larvas de três diferentes espécies de lepidópteros. A susceptibilidade da enzima tripsina à inibição por ILTI variou entre as três espécies de insetos. ILTI (0,08 µg) reduziu a atividade trípica em 95%, 71,8% e 20% nos IM de *S. frugiperda*, *A. ipsilon* e *T. absoluta*, respectivamente, sugerindo que ILTI é um candidato promissor para o controle desses insetos-praga.



**Figura 26:** Inibição da atividade proteolítica das proteinases intestinais de larvas de quarto instar por ILTI. BAPNA 1 mM foi utilizado como substrato. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As barras do desvio padrão (coeficiente de variação <20%) foram omitidas para maior clareza.

## 6 - Amplificação do gene *ilti*

Uma vez verificado que a proteína ILTI tem efeitos negativos no desenvolvimento dos insetos-praga testados e que, portanto poderia ter um grande potencial biotecnológico, buscamos obter a sequência do gene que codifica esta proteína. O objetivo foi de utilizar as técnicas de DNA recombinante para a produção heteróloga desta proteína em *E. coli* facilitando a produção e purificação de grandes quantidades de ILTI recombinante. Entretanto, a falta de sequências homólogas a ILTI nas bases de dados públicos não permitiu o desenho de *primers* específicos para este gene. Sendo assim, foram sintetizados *primers* degenerados como descrito nos materiais e métodos.

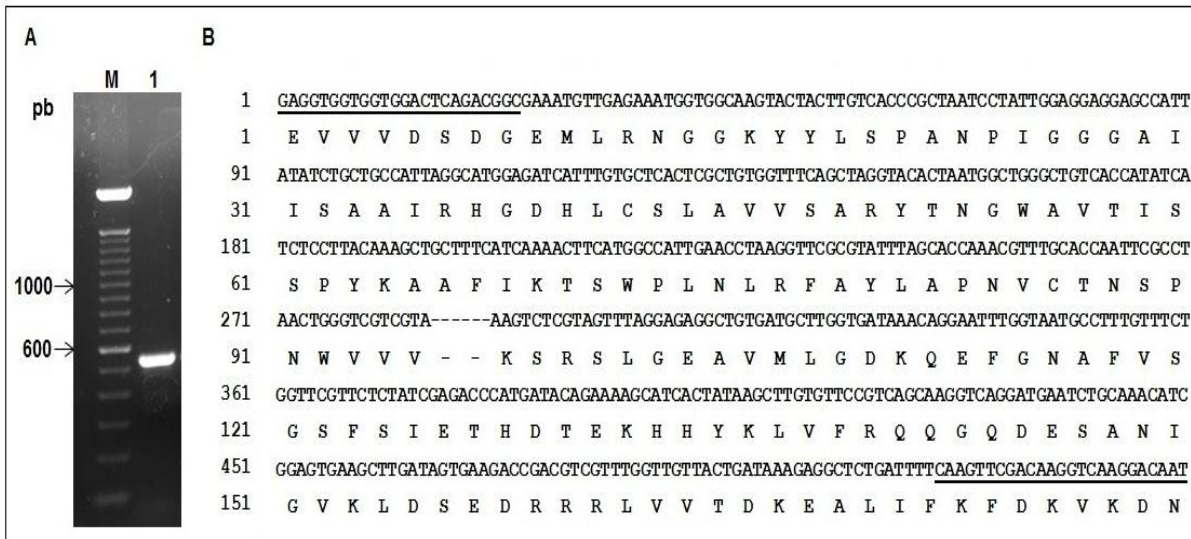
O gene *ilti* foi amplificado a partir do DNA genômico utilizando *primers* degenerados. O tamanho esperado do gene *ilti* foi estimado em 540 pb a partir dos dados da proteína (180

resíduos) purificada e caracterizada bioquimicamente por Macedo e colaboradores (2007). A utilização de *primers* degenerados complica consideravelmente a obtenção de fragmentos de PCR específicos já que podem anelar em outras regiões do genoma. Esta metodologia levou, portanto, muito tempo do desenvolvimento do projeto considerado. A Tabela 7 resume as etapas que permitiram a obtenção do gene *ilti* completo. Em cada uma dessas etapas foram usados os *primers* mencionados para a amplificação do gene a partir de DNA genômico de *ilti*. O fragmento obtido foi isolado a partir de gel de agarose e purificado utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega). Posteriormente o fragmento foi sequenciado e realizado o BLAST contra bancos de dados públicos para verificar a sua identidade. Baseado na sequência obtida foram desenhados novos *primers* agora específicos e usados em combinação com *primers* degenerados para a realização de novas amplificações até obter um fragmento de aproximadamente 540 pb correspondente ao gene *ilti* completo (Figura 27A).

**Tabela 7:** Resumo das etapas para obtenção da sequência completa do gene *ilti*.

Etapas	<i>Primers</i> utilizados para amplificação (Sequências na Tabela 1)	Fragmento obtido (Total 534 pb)
1	ILTI-F-1, ILTI-F-2, ILTI-F-3, ILTI-R-1 e ILTI-R-2	16 - 339
2	ILTI_F_int e ILTI-R-2	12 - 441
3	ILTI_F_333pb e ILTI_R1_fim	10 - 534
4	ILTI-F4inicio e ILTI-Rfinal	1 - 534

O fragmento de DNA amplificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy, os clones recombinantes foram analisados por PCR e digestão com enzima *EcoRI*. Um clone foi selecionado com base no tamanho esperado do fragmento de DNA (Figura 27A) e sequenciado. O resultado do sequenciamento revelou que o fragmento corresponde com o gene *ilti* completo sem íntrons (Figura 27B).

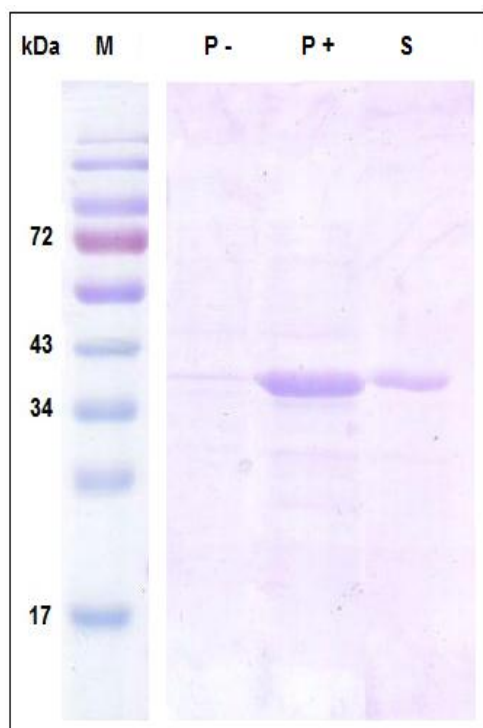


**Figura 27:** Isolamento e sequenciamento do gene *ilti*. (A) Amplificação do DNA genômico de *I. laurina*, utilizando pares de *primers* degenerados para gene ILTI. Linha M, 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Linha 1, produto de PCR obtido usando DNA genômico como molde. (B) Sequência de nucleotídeos de ILTI e sua sequência de aminoácidos deduzida. As localizações dos *primers* utilizados para amplificação do gene estão sublinhadas. (-) Indica a ausência de dois resíduos de aminoácidos em comparação com a análise da sequência de aminoácidos.

A sequência de aminoácidos deduzida a partir do clone de DNA está de acordo com a sequência de aminoácidos relatada de ILTI nativa (Macedo *et al.*, 2007), exceto pela ausência de dois resíduos de aminoácidos, Lys e Tyr, entre os resíduos Val 95 e Lys 98 da sequência de aminoácidos de ILTI nativa. Sendo assim, o gene *ilti* obtido tem um tamanho de 534 pb que codifica para uma proteína de 178 aminoácidos. A sequência completa de nucleotídeos do gene *ilti* foi submetida no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (GenBank número de acesso: JF766936).

## 7 - Expressão da proteína SUMO-reILTI em *E. coli*

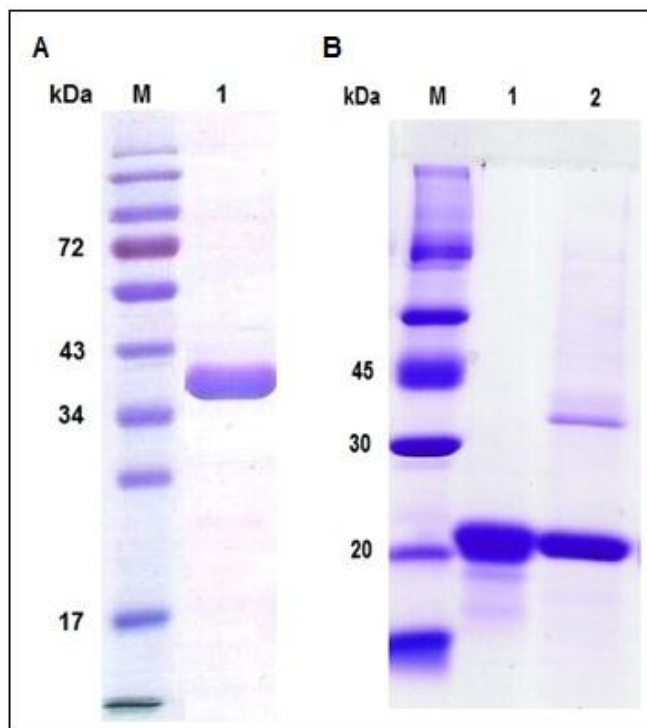
O fragmento de DNA, que codifica os 178 aminoácidos de ILTI, foi clonado em vetor pETSUMO, contendo histidinas no N-terminal, para facilitar a purificação, e a proteína SUMO, para aumentar a expressão e solubilidade da proteína recombinante. O vetor de expressão com a inserção foi então sequenciado completamente com os *primers* utilizados para a clonagem, direto: ILTI\_BamHI e reverso: ILTI\_Sall. A proteína clonada em vetor de pETSUMO foi expressa em *E. coli* (linhagem Rosetta II), com bom rendimento nas condições de expressão a 37 °C, durante 4 h (Figura 28).



**Figura 28:** Indução da proteína. SDS-PAGE 12,5% da indução nas condições de 37 °C e 250 rpm. M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Linha P -: cultura não-induzida, antes da adição de IPTG. Linha P +: *pellet*, após a adição do indutor IPTG. Linha S: fração solúvel, após lise bacteriana.

A proteína fusionada (SUMO-reILTI) foi purificada por afinidade em coluna de níquel - HiTrap, como mostrado na Figura 29A. A proteína de fusão purificada foi então tratada com SUMO-Protease (ULP-1), para clivar a proteína SUMO, e então novamente passada na coluna HiTrap para ligar SUMO. O material que não se ligou a coluna foi purificado utilizando cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina (Figura 29B), obtendo assim reILTI.



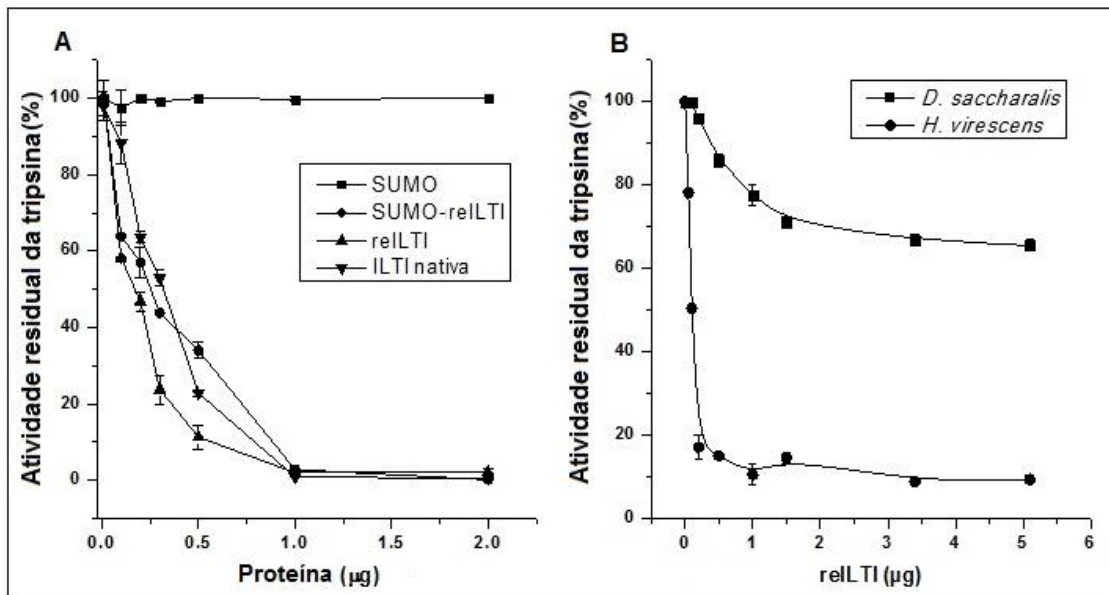


**Figura 29:** Análise SDS-PAGE (12.5%) da purificação da proteína reILTI (A) usando coluna de purificação Hitrap. Linha M, PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo scientific). Linha 1, proteína fusionada SUMO-reILTI e (B) coluna de afinidade Sepharose-tripsina. Linha M, marcador de peso molecular, Low Range (BIO-RAD). Linha 1, ILTI nativo (purificada de sementes de *I. aurina*). Linha 2, reILTI.

## 8 - Ação inibitória de reILTI frente a tripsina bovina e as proteinases de *D. saccharalis* e *H. virescens*

Uma vez tendo a proteína recombinante pura passamos a avaliar a atividade anti-trípica desta proteína. A atividade inibitória da proteína fusionada (SUMO-reILTI) e de reILTI foi testada e comparada com a atividade de ILTI nativa (Figura 30A). Quantidades crescentes das proteínas foram incubadas com uma quantidade fixa de tripsina bovina. Podemos verificar uma similaridade na atividade inibitória de reILTI, da proteína fusionada e de ILTI nativo em relação à tripsina bovina. A Figura 30B mostra o efeito de reILTI no homogenato de IM de larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens*. A concentração de 5,1 mg de reILTI reduziu a atividade trípica em 34,5% e 90,7% no IM de *D. saccharalis* e *H. virescens*, respectivamente. Estes resultados da atividade anti-trípica de reILTI *in vitro* são

promissores já que sugerem o potencial desta proteína como ferramenta para aumentar a resistência de plantas a esses insetos-praga.



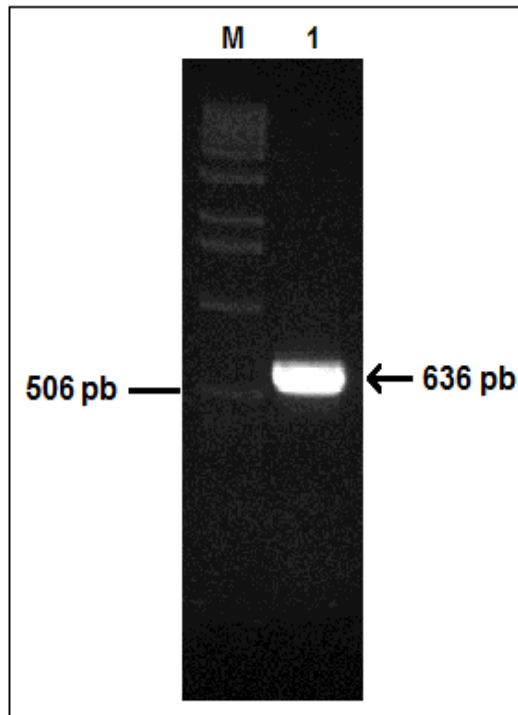
**Figura 30:** (A) Atividade inibitória de SUMO-reILTI, reILTI e ILTI nativa em relação à tripsina bovina. (B) Inibição por reILTI das enzimas tripsinas do IM de larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens*. Os experimentos foram realizados em triplicatas. A atividade trípica residual foi determinada usando BAPNA como substrato.

## 9 - Transformação genética de cana-de-açúcar

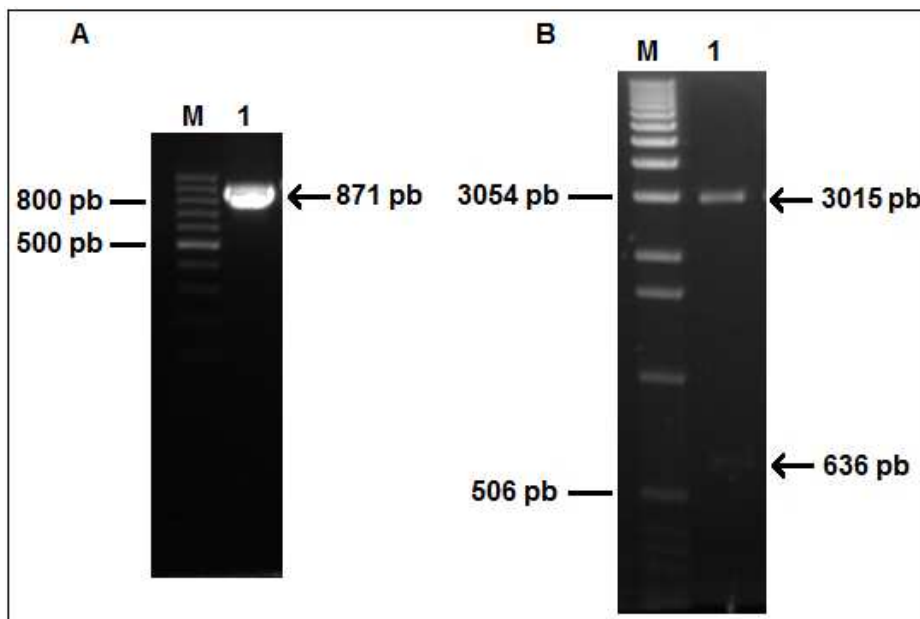
Um dos objetivos do presente trabalho é a obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar com o gene *ilti* para a posterior verificação do controle da infecção destas plantas por *D. saccharalis*. A transformação da cana-de-açúcar é um sistema dependente da regeneração de plantas *in vitro*. Esse processo é geralmente longo e, muitas vezes, permanece por um extenso período na fase de calos, que é o principal alvo na transformação genética de cana (PICELLI, 2010). Considerando as dificuldades que enfrentamos para a obtenção do gene *ilti* a partir do DNA genômico de *I. laurina*, decidimos desenvolver, em paralelo, os experimentos de transformação da cana utilizando um gene *ilti* sintético (*ilti-s*). O gene foi desenhado tendo em base o uso de códons da cana, como explicado nos materiais e métodos. O gene foi sintetizado pela empresa IDT e clonado no vetor pIDTSMART-AMP.

O gene *ilti-s* foi amplificado a partir do vetor pIDTSMART-AMP utilizando os *primers* direto ILTI\_BamHI\_F e o reverso ILTI\_KpnI\_R. O fragmento amplificado apresentou uma banda do tamanho esperado (636 pb) como observado na Figura 31. O gene *ilti-s* foi clonado no vetor pGEM-T Easy. Os clones recombinantes foram analisados por PCR, utilizando *primers* M13 direto e reverso e digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I (Figura 32A e B, respectivamente). Após a seleção dos clones positivos, o fragmento correspondente ao gene *ilti-s*, removido por meio das enzimas de restrição (*Bam*HI/*Kpn*I) foi ligado no vetor pUBILN, também digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I. O produto da reação de ligação foi transformado em *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) eletrocompetente, e a seleção dos transformantes foi realizada por análise de restrição usando as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, por PCR usando os *primers* específicos e por sequenciamento com *primers* pUBILN e os *primers* específicos para o gene. O resultado do sequenciamento revelou que o fragmento corresponde com o gene *ilti-s*.

O vetor contendo o gene *ilti-s* foi então co-bombardado, com o vetor expressando o gene de seleção *neo*, em calos de cana-de-açúcar. As plantas foram selecionadas utilizando o antibiótico geneticina.



**Figura 31:** Amplificação do gene *ilti-s* a partir do vetor pIDTSMART, utilizando pares de *primers* para a sequência completa do gene. Linha M: Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Linha 1: gene *ilti-s* obtido a partir de PCR.

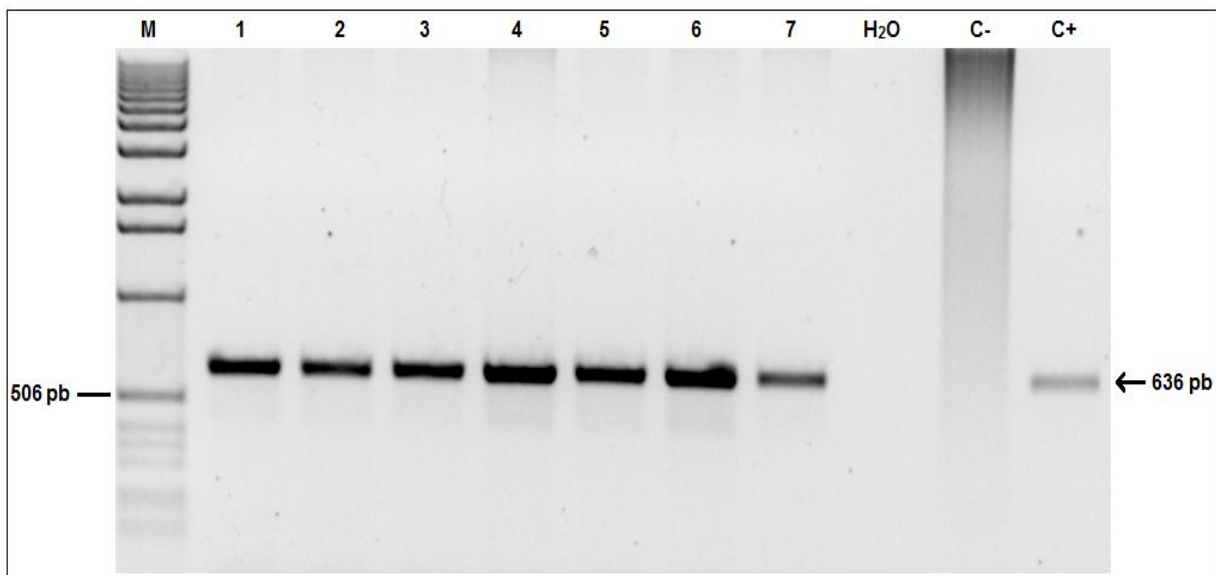


**Figura 32:** Gel de agarose (1%) do PCR e da digestão do clone recombinante. (A) amplificação do gene *ilti-s* no pGEM-T Easy por PCR. Linha M: Marcador de 100 pb DNA Ladder (Fermentas). Linha 1: confirmação do gene *ilti-s* obtido a partir de PCR. (B) digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Kpn*l. Linha M: Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Linha 1: pGEM-T Easy-gene *ilti-s* digerido com *Bam*HI e *Kpn*l.

## 9.1 - Confirmação das plantas de cana-de-açúcar transgênicas por PCR

As plantas regeneradas em meio seletivo antes de serem confirmadas como eventos de transformação foram chamadas de plantas candidatas. Para analisar a presença do gene *ilti-s* nas plantas, foi extraído DNA total das plantas tolerantes a geneticina e da planta não transformada para posteriores análises por PCR utilizando pares de *primers* específicos para amplificação completa do gene *ilti-s* (descrito no item 13.6.1).

Das 54 plantas candidatas analisadas para a presença do gene *ilti-s*, 22 plantas foram confirmadas quanto à integração do gene *ilti-s* no genoma vegetal. A Figura 33 representa um gel de agarose (1,0%) contendo 7 plantas confirmadas para o gene *ilti-s* dentre as 22 confirmadas pela amplificação do fragmento de 636 pb. Como controle negativo das reações utilizou-se a água (mix da reação apenas) e planta de cana-de-açúcar não transformada, enquanto que o controle positivo refere-se ao plasmídeo pUBILN contendo o gene *ilti-s*.



**Figura 33:** Gel de agarose (1,0%) referente ao resultado das reações de PCR, utilizando o DNA como molde, realizadas para análise da integração do gene *ilti-s*. M: Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); amostras 1 a 7: plantas que amplificaram o gene *ilti-s*; H<sub>2</sub>O: controle da reação; C-: controle negativo (planta não transformada); C+: controle positivo (plasmídeo pUBILN com gene *ilti-s*);

## 9.2 - Confirmação da integração do gene *ilti-s* via sequenciamento

Quatro amostras, confirmadas por PCR, quanto à integração do gene *ilti-s* no genoma vegetal foram sequenciadas e analisadas pela ferramenta BLAST presente no banco de dados do NCBI (*Genbank*). As sequências de nucleotídeos obtidas pelos sequenciamentos apresentou 100% de identidade com a do gene *ilti-s* utilizado na construção do vetor pUBILN (Figura 34). Sendo assim, podemos concluir que contamos com plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene de interesse.

```

Score = 1153 bits (624), Expect = 0.0
Identities = 624/624 (100%), Gaps = 0/624 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 10  ATGAGCATAACCGCGCGCGCGCACCTCCTCGTGCTCCCTCCGTCCTAGCTGCCATCTCC 69
          |||
Sbjct 1   ATGAGCATAACCGCGCGCGCGCACCTCCTCGTGCTCCCTCCGTCCTAGCTGCCATCTCC 60

Query 70  CTCTCGTGCGGCGCGCGCGGGAAGTGGTGGTTCGATTCCGATGGCGAAATGCTGCGCAAT 129
          |||
Sbjct 61  CTCTCGTGCGGCGCGCGCGGGAAGTGGTGGTTCGATTCCGATGGCGAAATGCTGCGCAAT 120

Query 130  GCGGCAAGTACTACCTCTCCCCGGCGAACC CGATTGGCGGCGCGCCATTATTTCCGCC 189
          |||
Sbjct 121  GCGGCAAGTACTACCTCTCCCCGGCGAACC CGATTGGCGGCGCGCCATTATTTCCGCC 180

Query 190  GCGATCAGGCATGGCGATCACCTCTGCTCCCTCGCCGTCGTCCTCCGCGGCTATAACCAAC 249
          |||
Sbjct 181  GCGATCAGGCATGGCGATCACCTCTGCTCCCTCGCCGTCGTCCTCCGCGGCTATAACCAAC 240

Query 250  GGCCTGGGCGGTGACCATCTCCTCCCCTTACAAGGCCGCGTTTCATTAAGACCTCCTGGCCT 309
          |||
Sbjct 241  GGCCTGGGCGGTGACCATCTCCTCCCCTTACAAGGCCGCGTTTCATTAAGACCTCCTGGCCT 300

Query 310  CTGAACCTCCGCTTCGCCTATCTGGCCCCGAATGTGTGCACTAACTCCCCTAACTGGGTG 369
          |||
Sbjct 301  CTGAACCTCCGCTTCGCCTATCTGGCCCCGAATGTGTGCACTAACTCCCCTAACTGGGTG 360

Query 370  GTCGTCAAGTACAAGTCCAGGTCCCTGGGCGAAGCCGTCATGCTGGGCGACAAGCAAGAG 429
          |||
Sbjct 361  GTCGTCAAGTACAAGTCCAGGTCCCTGGGCGAAGCCGTCATGCTGGGCGACAAGCAAGAG 420

Query 430  TTCGGCAACGCGTTCGTGTCCGGCTCCTTCTCCATCGAGACTCACGATAACCGAAAAGCAT 489
          |||
Sbjct 421  TTCGGCAACGCGTTCGTGTCCGGCTCCTTCTCCATCGAGACTCACGATAACCGAAAAGCAT 480

Query 490  CATTATAAGCTGGTGTGTTTAGGCAGCAGGGCCAGGATGAATCCGCCAACATCGGCGTCAA 549
          |||
Sbjct 481  CATTATAAGCTGGTGTGTTTAGGCAGCAGGGCCAGGATGAATCCGCCAACATCGGCGTCAA 540

Query 550  CTCGACTCCGAAGATCGCCGCCGCTGGTTCGTACCGATAAGGAGGCCCTGATCTTCAAG 609
          |||
Sbjct 541  CTCGACTCCGAAGATCGCCGCCGCTGGTTCGTACCGATAAGGAGGCCCTGATCTTCAAG 600

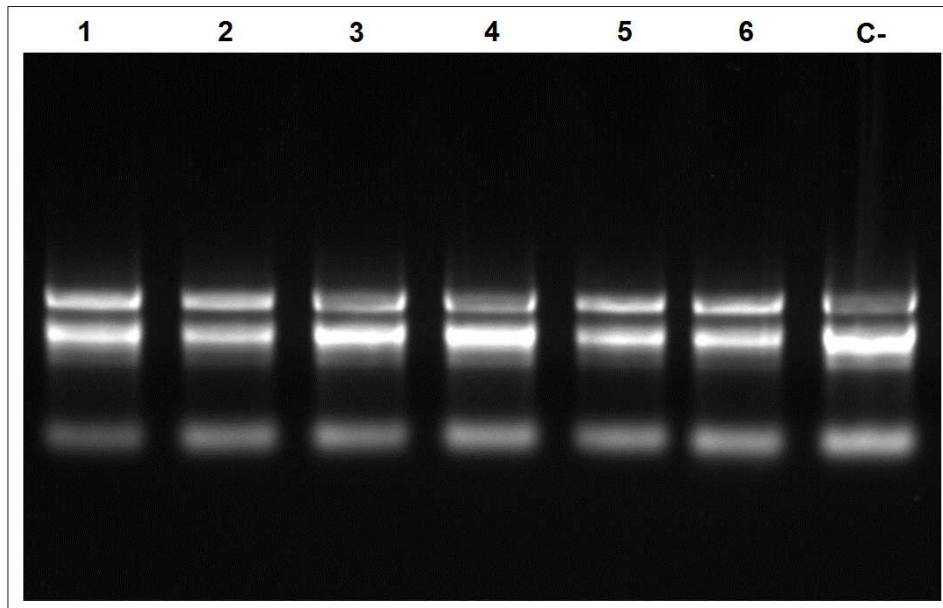
Query 610  TTCGACAAGGTGAAGGACAATTGA 633
          |||
Sbjct 601  TTCGACAAGGTGAAGGACAATTGA 624

```

**Figura 34:** Resultado obtido através da ferramenta BLAST no banco de dados do NCBI (*GenBank*) após análise da sequência do produto de PCR das 4 plantas transgênicas avaliadas quanto a presença do gene *ilti-s*. *Sbjct* representa a sequência do gene sintético clonado no vetor pUBILN e *Query* a sequência gerada pelo sequenciamento.

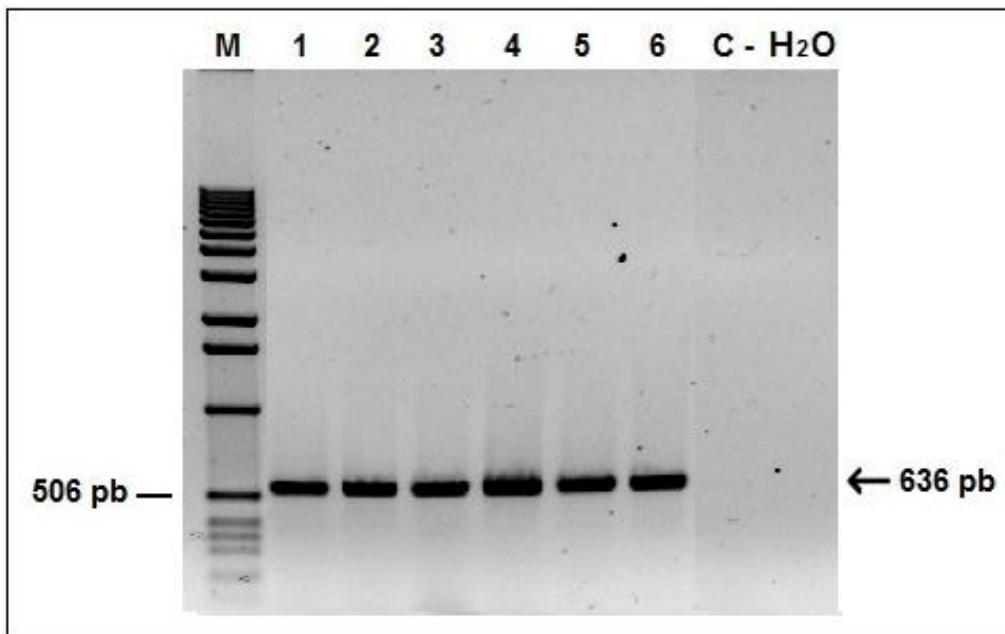
### 9.3 - Análise de expressão do gene *ilti-s* em folhas das plantas de cana-de-açúcar transformadas

No intuito de verificar a expressão do transgene *ilti-s* nas plantas transgênicas que apresentaram PCR positivo para o gene, 6 plantas dentre essas 22 transgênicas obtidas foram selecionadas para análise de expressão por PCR, utilizando cDNA como molde. O RNA total extraído das 6 plantas transgênicas selecionadas e de 1 planta controle não transformada foi tratado com DNase I e analisado em gel de agarose 1,0%, o qual indicou integridade e boa qualidade do RNA obtido (Figura 35).



**Figura 35:** Fotografia obtida do gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídeo referente ao RNA total extraído, pelo método do Trizol, de 8 plantas transgênicas para o gene *ilti-s* (amostras 1 a 8) e 2 plantas não transformadas (C-).

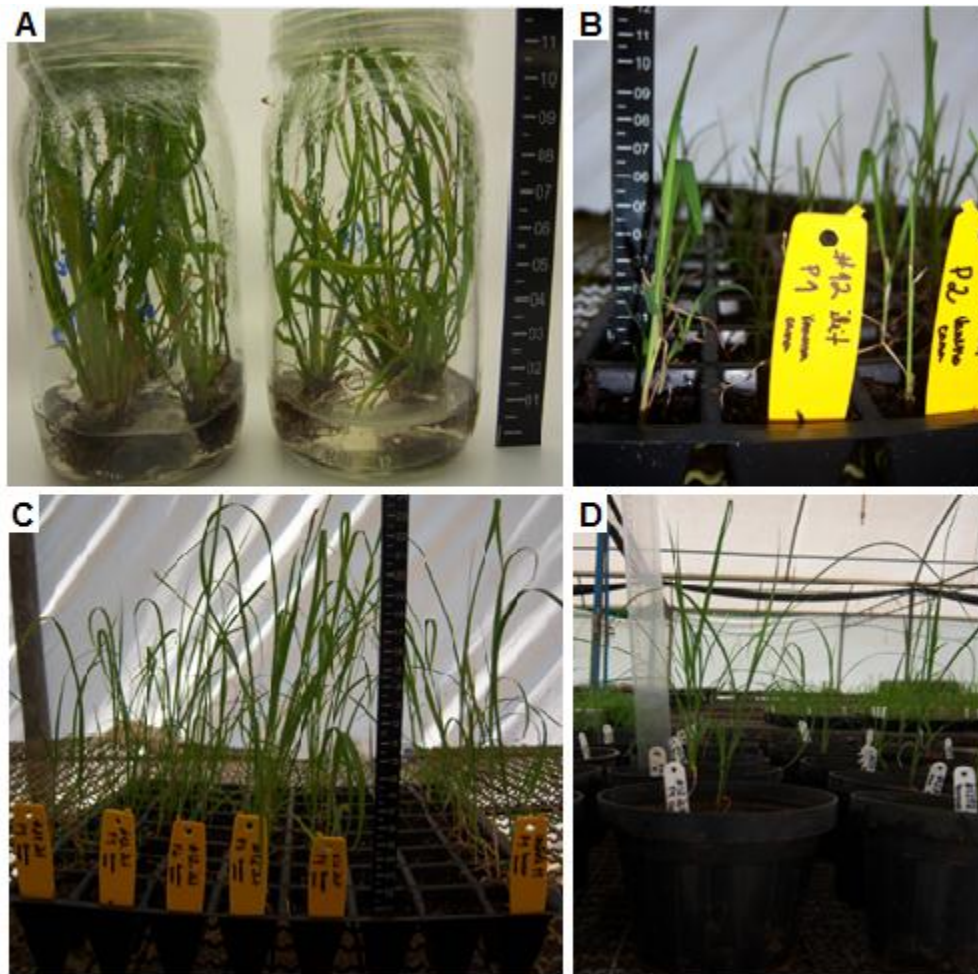
O cDNA foi empregado nas reações de PCR para verificar expressão do gene de interesse *ilti-s* inserido via transformação genética. A reação de PCR foi realizada com *primers* específicos à sequência do transgene (Figura 36). Verificou-se que todas as plantas transgênicas analisadas apresentaram uma banda no tamanho do gene *ilti-s* sugerindo a expressão deste gene nas plantas transformadas.



**Figura 36:** Gel de agarose (1,0%) referente ao resultado das reações de PCR, utilizando o cDNA como molde, realizadas para análise da integração do gene *ilti-s*. M: Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); amostras 1 a 6: plantas que amplificaram o gene *ilti-s*; C -: controle negativo (planta não transformada); H<sub>2</sub>O: controle da reação de PCR.

Uma vez confirmada a integração do transgene contendo o gene *ilti-s* por PCR no genoma da cana-de-açúcar, as 22 plantas transgênicas foram transferidas para o meio MS fresco e sem adição de agente seletivo para estimular o perfilhamento *in vitro* das plantas (Figura 37A). Depois de 30 dias, 6 plantas transgênicas já possuíam cerca de 2 a 3 perfilhos cada e, desta forma, um dos perfilhos de cada evento de transformação foram coletados e transferidos do ambiente *in vitro* para uma bandeja contendo substrato (Figura 37B), e colocadas na casa de vegetação. Após 30 dias as plantas de cana-de-açúcar foram transferidas para vasos maiores e mantidas na casa de veg/etação (Figura 37C e D).



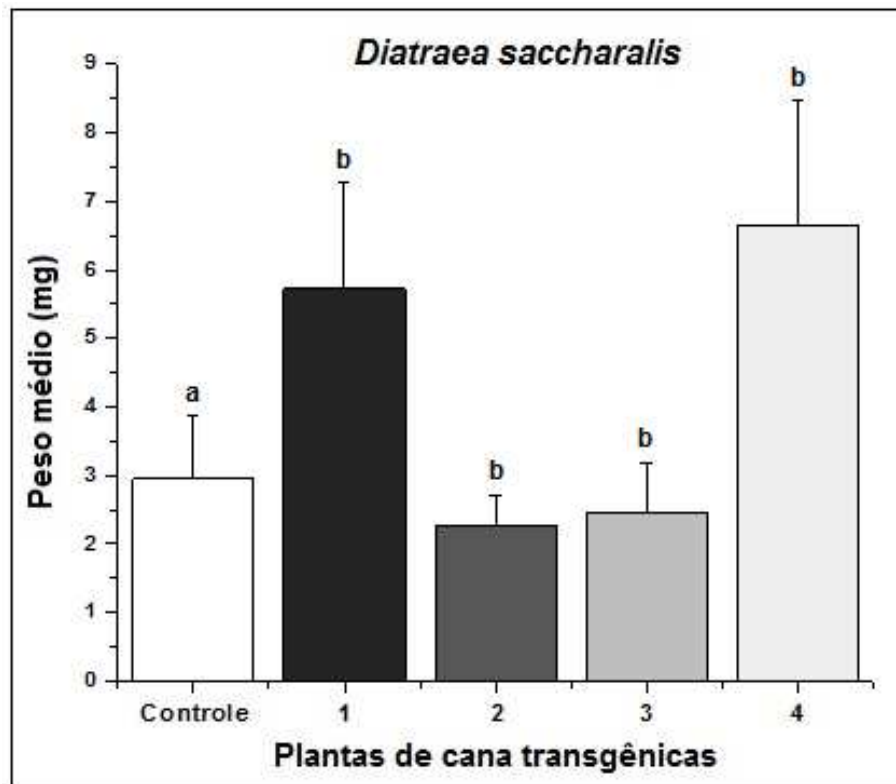


**Figura 37:** (A) Fotos da cana-de-açúcar controle e transformadas *in vitro*. (B) plantas transferidas para bandeja com substrato. (C) após 30 dias as plantas estavam com o dobro de tamanho e (D) foram transferidas para vaso.

#### **9.4 – Efeito de plantas de cana-de-açúcar transgênicas sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis***

Larvas de *D. saccharalis* foram alimentadas com cinco tratamentos: controle e plantas transgênicas contendo o gene *ilti-s* (plantas 1, 2, 3 e 4). O peso médio das larvas foi determinado após 22 dias da inoculação. O efeito das plantas transgênicas no crescimento das larvas de *D. saccharalis* está representado na Figura 38. Podemos verificar que houve uma redução de 23,4% e 17,3% no peso médio das larvas alimentadas com folhas de cana transgênicas 2 e 3, respectivamente, quando comparada com as larvas que alimentaram com folhas não transformadas (controle). No entanto, as larvas

alimentadas com as plantas transgênicas 1 e 4 tiveram um aumento significativo no peso (94% e 125%, respectivamente). Outro parâmetro importante a ser determinado neste experimento é a sobrevivência das larvas após o tratamento. Entretanto, tivemos alguns problemas experimentais devido ao grande número de larvas total do experimento ( $n > 525$ ) e o tamanho dos indivíduos dificultando a obtenção de resultados conclusivos sobre o efeito do transgênico na sobrevivência.



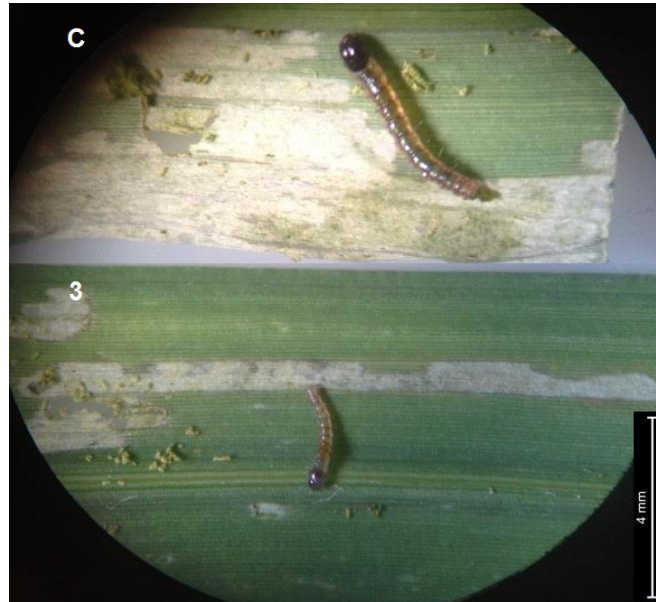
**Figura 38:** Efeito das plantas transgênicas com o gene *ilti-s* no desenvolvimento das larvas de *D. saccharalis*. Peso médio das larvas alimentadas com folhas de cana não transformadas (controle) e larvas alimentadas com folhas transgênicas (1 a 4). Cada valor representa a média  $\pm$  SD. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

A Figura 39 ilustra o efeito das plantas de cana transgênicas no desenvolvimento das larvas de *D. saccharalis*, após 24 dias de inoculação. A imagem corrobora os resultados apresentados no gráfico anterior.



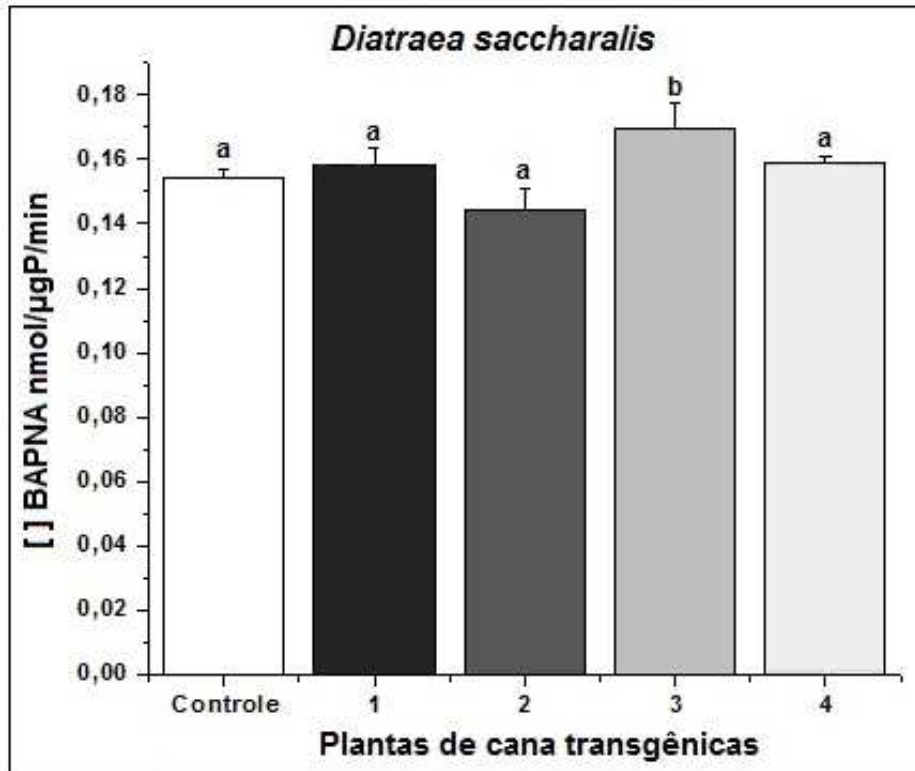
**Figura 39:** Foto ilustrando a variação no tamanho das larvas de *D. saccharalis* com 24 dias após inoculação em folhas de cana-de-açúcar transgênicas. Linha C: larva alimentada com folhas de cana não transformadas; Linha 1 a 4: larvas alimentadas com folhas de cana transgênicas.

Um fato que chamou muito a atenção durante o experimento foi a diferença na quantidade de folha consumida pelas larvas. A Figura 40 ilustra a quantidade de folha ingerida pelas larvas controle e pelas larvas alimentadas com a planta transgênica 3 após dois dias de consumo. Observa-se claramente que as larvas alimentadas com a planta 3 consumiu menos folha quando comparada com o controle. Esse comportamento também foi observado nas larvas que se alimentaram com as folhas da planta 2. Larvas alimentadas com folhas dos transgênicos 1 e 4, inicialmente consumiram quantidades de folhas semelhantes às larvas controle. Entretanto, foi verificado um aumento no consumo no final do experimento. As fotos foram tiradas 8 dias após o início dos tratamentos.



**Figura 40:** Foto ilustrando a quantidade de folha de cana consumida pela larva controle (C) e pela larva alimentada com folha transgênica (planta 3).

Ensaio trípico foi realizado para avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo das larvas que se alimentaram com plantas transgênicas. As enzimas presentes no intestino médio das larvas alimentadas com folhas controle e com folhas transgênicas tiveram sua atividade avaliada através da hidrólise do substrato BAPNA. As larvas alimentadas com as plantas transgênicas 1, 2 e 4 não mostraram alterações no perfil enzimático do intestino quando comparadas com o controle. Entretanto foi verificado um aumento de 9,8% na atividade trípica das larvas alimentadas com a planta transgênica 3 (Figura 41).



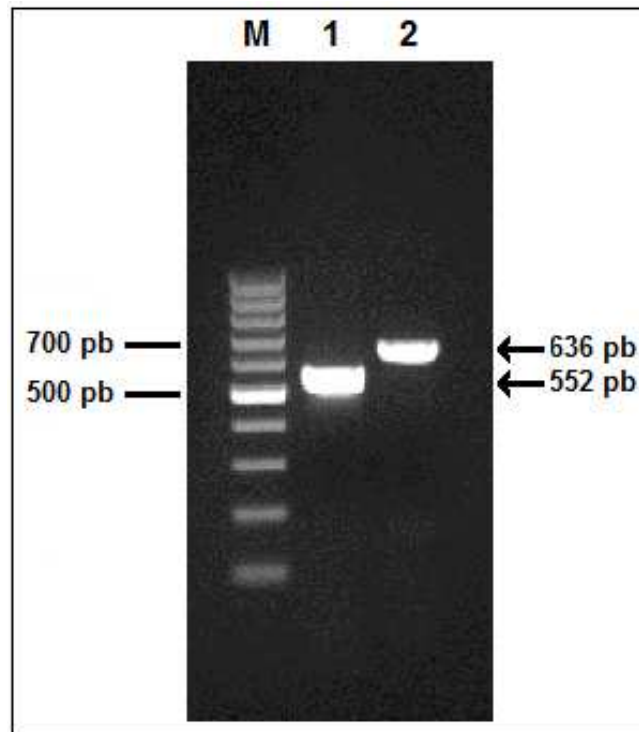
**Figura 41:** Resposta das proteinases do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* à ingestão de plantas de cana transgênicas contendo o gene *ilti-s*. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

## 10 - Transformação genética de tabaco

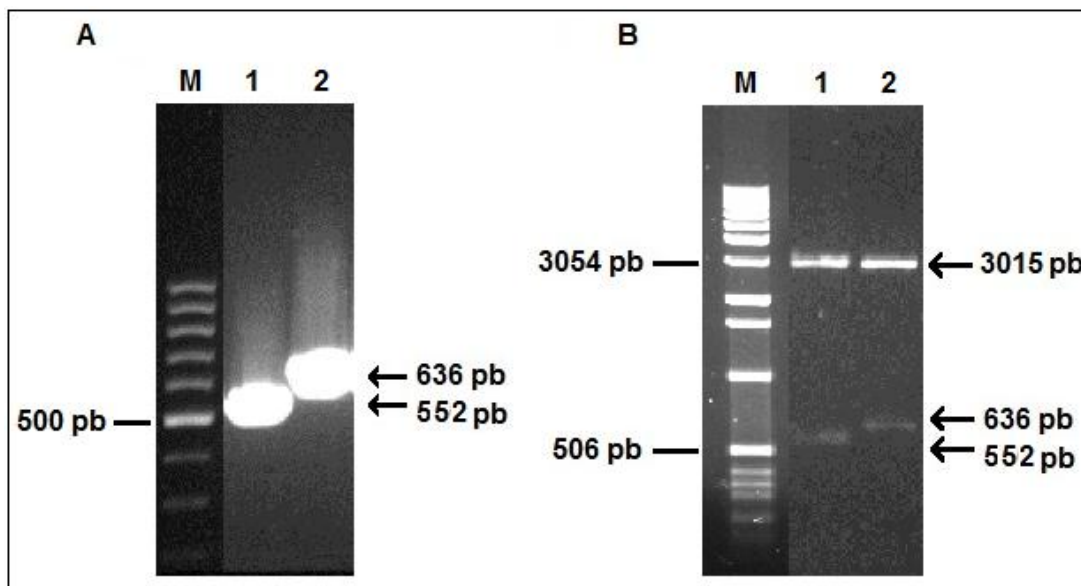
Uma vez obtido o gene *ilti* optamos pela transformação de plantas de tabaco devido a sua manipulação genética ser relativamente simples já que se trata de uma planta de fácil regeneração *in vitro*. As plantas de tabaco foram então transformadas com os genes *ilti* e *ilti-s*. Como descrito nos Métodos, os genes *ilti* e *ilti-s* foram amplificados a partir do DNA genômico de *I. aurina* e do plasmídeo pIDSMART-AMP respectivamente (Figura 42). Após a obtenção dos fragmentos, estes sofreram dois eventos de subclonagem sucessivos (i) em pGEM-T Easy e (ii) no vetor pRT104. As análises dos clones recombinantes foram realizadas por PCR, digestão com as enzimas *SacI/BamHI* (gene *ilti*) e *KpnI/BamHI* (gene *ilti-s*) e sequenciamento. Estes resultados estão mostrados nas Figuras 43A e B, respectivamente. Como produto da subclonagem em pRT104 foi obtido o cassete (35S P :: gene :: Poly-A) para cada gene em estudo. Esses cassetes foram

clonados no vetor pCAMBIA2301 gerando os plasmídeos pCAMBIA2301-*ilti* e pCAMBIA2301-*ilti-s*, respectivamente. A seleção dos transformantes foi realizada por três vias: por análise de restrição usando a mesma enzima utilizada para a clonagem, por PCR usando os *primers* específicos (Figuras 44A e B) e por sequenciamento com *primers* específicos para cada um dos genes. O resultado do sequenciamento revelou que o fragmento clonado corresponde com o gene *ilti* e o *ilti-s* em cada caso.

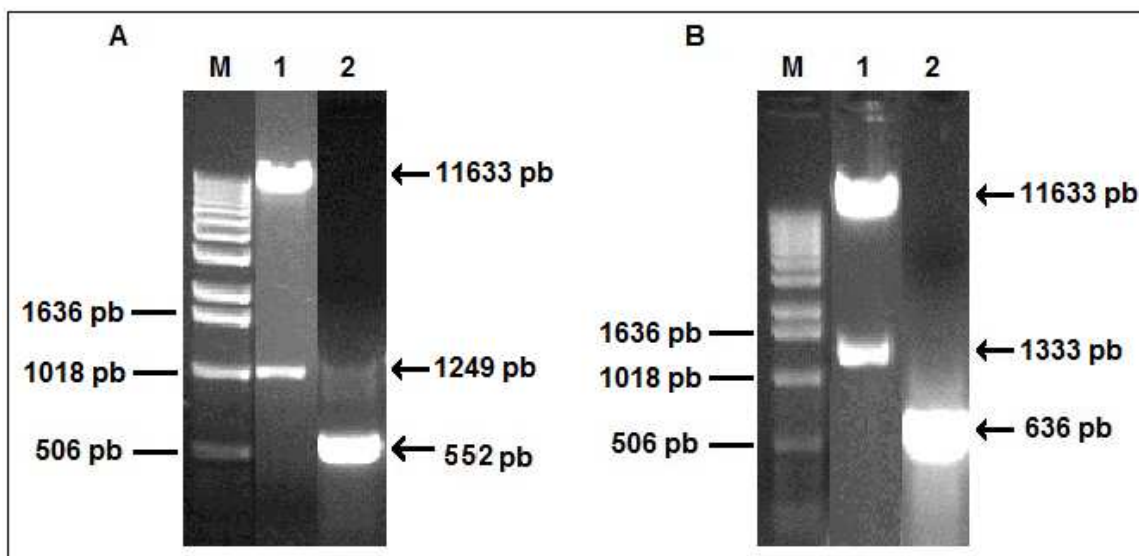
Os vetores pCAMBIA2301-*ilti* e pCAMBIA2301-*ilti-s* foram transformados na linhagem desarmada GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Os clones de *Agrobacterium* que se desenvolveram em meio seletivo contendo canamicina foram analisados por PCR. Uma vez verificada a presença do gene, as bactérias recombinantes foram utilizadas para transformar os discos foliares de tabaco. As plantas de tabaco foram selecionadas utilizando o antibiótico canamicina.



**Figura 42:** Amplificação dos genes *ilti* e *ilti-s* a partir do DNA genômico e do vetor pIDTSMART, respectivamente, utilizando pares de *primers* para a sequência completa do gene. Linha M: Marcador 100 pb DNA Ladder (Fermentas). Linha 1: gene *ilti* obtido a partir de PCR. Linha 2: gene *ilti-s* obtido a partir de PCR.



**Figura 43:** Gel de agarose (1%) do PCR e da digestão dos clones recombinantes. (A) amplificação dos genes *ilti* e *ilti-s* no pGEM-T Easy por PCR. Linha M: Marcador de 100 pb DNA Ladder (Fermentas). Linha 1: confirmação do gene *ilti* obtido a partir de PCR. Linha 2: confirmação do gene *ilti-s* obtido a partir de PCR. (B) Digestão com as enzimas de restrição *SacI/BamHI* (gene *ilti*) e *KpnI/BamHI* (gene *ilti-s*). Linha M: Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Linha 1: pGEM-T Easy-gene *ilti* digerido com *SacI* e *BamHI*. Linha 2: pGEM-T Easy-gene *ilti-s* digerido com *KpnI* e *BamHI*.

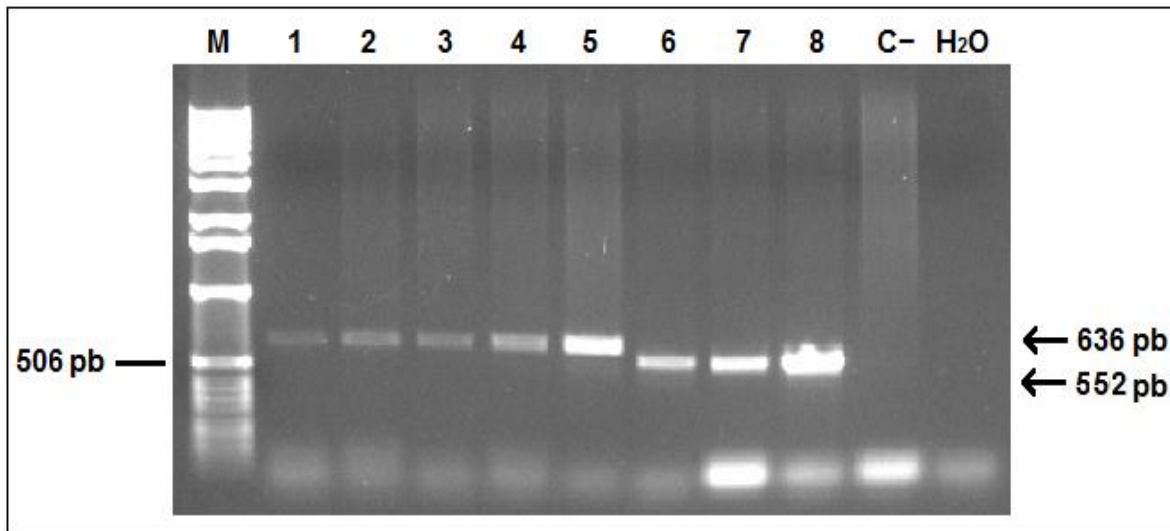


**Figura 44:** Gel de agarose (1%) do PCR e da digestão dos clones recombinantes. (A) amplificação e digestão do gene *ilti* no pCAMBIA2301. Linha M: Marcador de 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Linha 1: pCAMBIA2301-gene *ilti* digerido com *PstI*. Linha 2: confirmação do gene *ilti* obtido a partir de PCR. (B) amplificação e digestão do gene *ilti-s* no pCAMBIA2301. Linha M: Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Linha 1: pCAMBIA2301-gene *ilti-s* digerido com *HindIII*. Linha 2: confirmação do gene *ilti-s* obtido a partir de PCR.

### 10.1 - Confirmação das plantas de tabaco transgênicas por PCR

As plantas regeneradas em meio seletivo antes de serem confirmadas como eventos de transformação foram chamadas de plantas candidatas. Para analisar a presença dos genes *ilti* e *ilti-s* nas plantas, foi extraído DNA total das plantas tolerantes a canamicina e da planta não transformada para posteriores análises por PCR utilizando pares de *primers* específicos para amplificação completa dos genes *ilti* e *ilti-s* (descrito no item 14.6.1).

Sete plantas candidatas foram analisadas para a presença do gene *ilti* e nove plantas candidatas foram analisadas para a presença do gene *ilti-s*. Todas as plantas foram confirmadas quanto à integração do gene *ilti* no genoma vegetal e 6 plantas foram confirmadas quanto à integração do gene *ilti-s* no genoma vegetal. A Figura 45 representa um gel de agarose (1,0%) contendo 5 plantas confirmadas para o gene *ilti-s* e 3 plantas confirmadas para o gene *ilti* pela amplificação do fragmento de 636 pb e 552 pb, respectivamente. Como controle negativo das reações utilizou-se a água (mix da reação apenas) e planta de tabaco não transformada.



**Figura 45:** Gel de agarose (1,0%) referente ao resultado das reações de PCR, utilizando o DNA como molde, realizadas para análise da integração dos genes *ilti* e *ilti-s*. M: Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); amostras 1 a 5: plantas de tabaco que amplificaram o gene *ilti-s*; amostras 6 a 8: plantas de tabaco que amplificaram o gene *ilti*; C-: controle negativo (planta não transformada); H<sub>2</sub>O: controle da reação.



## 10.2 - Confirmação da integração dos genes *ilti* e *ilti-s* no genoma da planta via sequenciamento

Três amostras de plantas confirmadas por PCR quanto à integração do gene *ilti* e do gene *ilti-s* no genoma vegetal foram sequenciadas e analisadas pela ferramenta BLAST presente no banco de dados do NCBI (*Genbank*). As sequências de nucleotídeos obtidas pelos sequenciamentos apresentaram 100% de identidade com a dos genes clonados nos vetores pCAMBIA2301-*ilti* e pCAMBIA2301-*ilti-s* (Figuras 46 e 47, respectivamente). Sendo assim, podemos concluir que contamos com plantas de tabaco transformadas com os genes de interesse.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1020 bits(552)	0.0	552/552(100%)	0/552(0%)	Plus/Minus
Query 3	GGATCCTCAATTGTCCTTGACCTTGTCGAACTTGAAAATCAGAGCCTCTTTATCAGTAAC			62
Sbjct 552	GGATCCTCAATTGTCCTTGACCTTGTCGAACTTGAAAATCAGAGCCTCTTTATCAGTAAC			493
Query 63	AACCAAACGACGTCGGTCTTCACTATCAAGCTTCACTCCGATGTTTGCAGATTCACTCTG			122
Sbjct 492	AACCAAACGACGTCGGTCTTCACTATCAAGCTTCACTCCGATGTTTGCAGATTCACTCTG			433
Query 123	ACCTTGCTGACGGAACACAAGCTTATAGIGATGCTTTTCTGTATCATGGGTCTCGATAGA			182
Sbjct 432	ACCTTGCTGACGGAACACAAGCTTATAGIGATGCTTTTCTGTATCATGGGTCTCGATAGA			373
Query 183	GAACGAACCAGAAACAAAGGCATTACCAAATTCCTGTTTATCACCAAGCATCACAGCCTC			242
Sbjct 372	GAACGAACCAGAAACAAAGGCATTACCAAATTCCTGTTTATCACCAAGCATCACAGCCTC			313
Query 243	TCCTAAACTACGAGACTTTACGACGACCCAGTTAGGCGAATTGGTGCAAACGTTTGGTGC			302
Sbjct 312	TCCTAAACTACGAGACTTTACGACGACCCAGTTAGGCGAATTGGTGCAAACGTTTGGTGC			253
Query 303	TAAATACGCGAACCTTAGGTTCAATGGCCATGAAGTTTTGATGAAAGCAGCTTTGTAAGG			362
Sbjct 252	TAAATACGCGAACCTTAGGTTCAATGGCCATGAAGTTTTGATGAAAGCAGCTTTGTAAGG			193
Query 363	AGATGATATGGTGACAGCCCAGCCATTAGTGTACCTAGCTGAAACCACAGCGAGTGAGCA			422
Sbjct 192	AGATGATATGGTGACAGCCCAGCCATTAGTGTACCTAGCTGAAACCACAGCGAGTGAGCA			133
Query 423	CAATGATCTCCATGCCTAATGGCAGCAGATATAATGGCTCCTCCTCCAATAGGATTAGC			482
Sbjct 132	CAATGATCTCCATGCCTAATGGCAGCAGATATAATGGCTCCTCCTCCAATAGGATTAGC			73
Query 483	GGGTGACAAGTAGTACTTGCCACCATTCTCAACATTCGCCGTCTGAGTCCACCACCAC			542
Sbjct 72	GGGTGACAAGTAGTACTTGCCACCATTCTCAACATTCGCCGTCTGAGTCCACCACCAC			13
Query 543	CTCCATGAGCTC	554		
Sbjct 12	CTCCATGAGCTC	1		

**Figura 46:** Resultado obtido através da ferramenta BLAST no banco de dados do NCBI (*GenBank*) após análise da sequência do produto de PCR das 3 plantas transgênicas avaliadas quanto a presença do gene *ilti*. *Sbjct* representa a sequência do gene *ilti* clonado no vetor pCAMBIA2301 e *Query* a sequência gerada pelo sequenciamento.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1160 bits(628)	0.0	628/628(100%)	0/628(0%)	Plus/Plus
Query 7	CCATGAGCATACCGCGCGCCGCGCACCTCCTCGTGCTCCTCTCCGTCCTAGCTGCCATCT			66
Sbjct 5	CCATGAGCATACCGCGCGCCGCGCACCTCCTCGTGCTCCTCTCCGTCCTAGCTGCCATCT			64
Query 67	CCCTCTCGTGCGGCGCCGCGCGGAAGTGGTGGTCGATCCGATGGCGAAATGCTGCGCA			126
Sbjct 65	CCCTCTCGTGCGGCGCCGCGCGGAAGTGGTGGTCGATCCGATGGCGAAATGCTGCGCA			124
Query 127	ATGGCGGCAAGTACTACCTCTCCCCGGCGAACCAGATTGGCGGCGCGCCATTATTTCGG			186
Sbjct 125	ATGGCGGCAAGTACTACCTCTCCCCGGCGAACCAGATTGGCGGCGCGCCATTATTTCGG			184
Query 187	CCGCGAICAGGCATGGCGAICACCTCTGCTCCCTCGCCGTCGTCCTCCGCGCGCTATACCA			246
Sbjct 185	CCGCGAICAGGCATGGCGAICACCTCTGCTCCCTCGCCGTCGTCCTCCGCGCGCTATACCA			244
Query 247	ACGGCTGGGCCGIGACCAICTCTCTCCCTTACAAGGCCGCGTTCATTAAGACCTCCTGGC			306
Sbjct 245	ACGGCTGGGCCGIGACCAICTCTCTCCCTTACAAGGCCGCGTTCATTAAGACCTCCTGGC			304
Query 307	CTCTGAACCTCCGCTTCGCCTATCTGGCCCCGAATGTGTGCACTAACTCCCTAACTGGG			366
Sbjct 305	CTCTGAACCTCCGCTTCGCCTATCTGGCCCCGAATGTGTGCACTAACTCCCTAACTGGG			364
Query 367	TGGTCGTC AAGTACAAGTCCAGGTCCTGGGCGAAGCCGTCATGCTGGGCGACAAGCAAG			426
Sbjct 365	TGGTCGTC AAGTACAAGTCCAGGTCCTGGGCGAAGCCGTCATGCTGGGCGACAAGCAAG			424
Query 427	AGTTCGGCAACGCGTTCGIGTCCGGCTCCTTCTCCAICGAGACTCACGATACCGAAAAGC			486
Sbjct 425	AGTTCGGCAACGCGTTCGIGTCCGGCTCCTTCTCCAICGAGACTCACGATACCGAAAAGC			484
Query 487	ATCATTATAAGCTGGTGTITAGGCAGCAGGGCCAGGATGAATCCGCCAACATCGGCGTCA			546
Sbjct 485	ATCATTATAAGCTGGTGTITAGGCAGCAGGGCCAGGATGAATCCGCCAACATCGGCGTCA			544
Query 547	AACTCGACTCCGAAGATCGCCGCCCTGGTCGTCACCGATAAGGAGGCCCTGATCTTCA			606
Sbjct 545	AACTCGACTCCGAAGATCGCCGCCCTGGTCGTCACCGATAAGGAGGCCCTGATCTTCA			604
Query 607	AGTTCGACAAGGTGAAGGACAATTGAGG 634			
Sbjct 605	AGTTCGACAAGGTGAAGGACAATTGAGG 632			

**Figura 47:** Resultado obtido através da ferramenta BLAST no banco de dados do NCBI (*GenBank*) após análise da sequência do produto de PCR das 3 plantas transgênicas avaliadas quanto a presença do gene *ilti-s*. *Sbjct* representa a sequência do gene *ilti-s* clonado no vetor pCAMBIA2301 e *Query* a sequência gerada pelo sequenciamento.

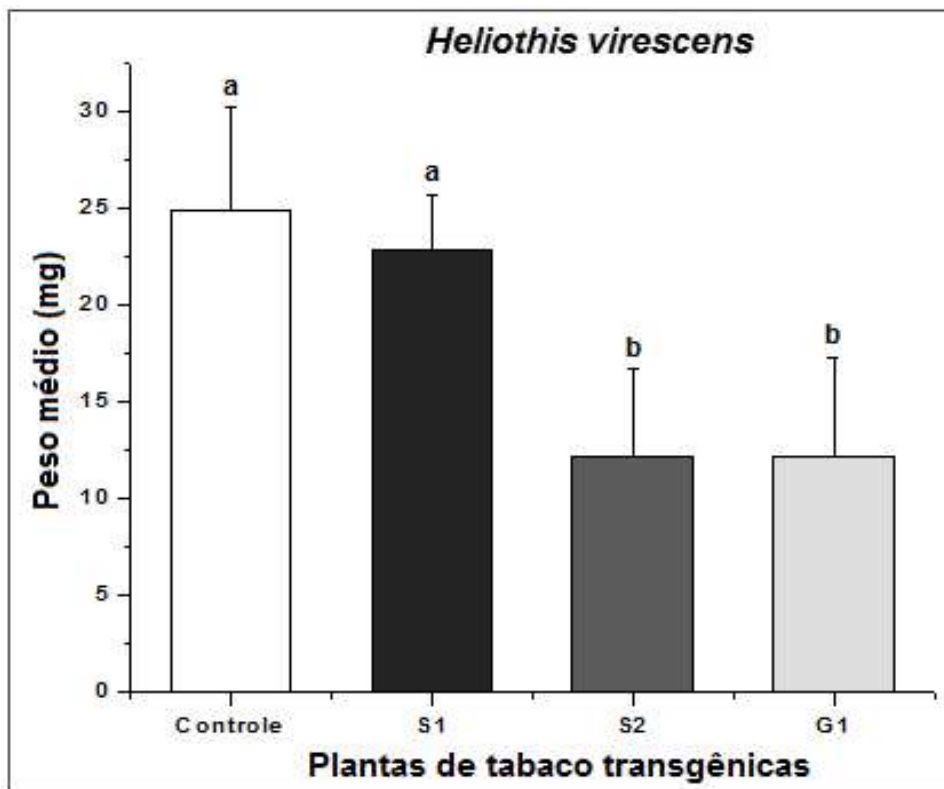
Uma vez confirmada a integração dos transgenes no genoma de tabaco, 1 planta transgênica contendo o gene *ilti* (planta G1) foi repicada para obtenção de clones, o mesmo foi realizado com 2 plantas transgênicas contendo o gene *ilti-s* (plantas S1 e S2). Após enraizamento as plantas foram transferidas para vasos e colocadas na casa de vegetação (Figura 48).



**Figura 48:** (A) Planta de tabaco com 8 dias após o plantio. (B) Planta de tabaco com 30 dias após o plantio. (C) Plantas de tabaco controle (vaso rosa), plantas de tabaco transgênicas contendo o gene *ilti* (vaso azul) e plantas de tabaco transgênicas contendo o gene *ilti-s* (vaso amarelo).

### 10.3 – Efeito de plantas de tabaco transgênicas sobre o desenvolvimento de *H. virescens*

Larvas de *H. virescens* foram alimentadas com quatro tratamentos: controle, planta transgênica contendo o gene *ilti* (G1) e plantas transgênicas contendo o gene *ilti-s* (S1 e S2). O peso médio das larvas de *H. virescens* e o número de indivíduos sobreviventes foram determinados após 13 dias da inoculação. O efeito das plantas transgênicas no crescimento das larvas de *H. virescens* está representado na Figura 49. Podemos verificar que houve uma redução de 51% (estatisticamente significativa) no peso médio das larvas alimentadas com folhas de tabaco transgênicas S2 e G1 quando comparadas com as larvas que se alimentaram com folhas não transformadas. Larvas alimentadas com plantas S1 não apresentaram uma redução significativa no peso quando comparado com o controle. Entretanto, análises da sobrevivência larval mostraram uma redução de 62,5% e 38% para as larvas que se alimentaram com folhas de tabaco transgênicas S1 e G1.



**Figura 49:** Efeito das plantas de tabaco transgênicas com os genes *ilti* e *ilti-s* no desenvolvimento das larvas de *H. virescens*. Peso médio das larvas alimentadas com folhas de tabaco não transformadas (controle), larvas alimentadas com folhas transgênicas contendo o gene *ilti-s* (S1 e S2) e larvas alimentadas com folhas transgênicas contendo o gene *ilti* (G1). Cada valor representa a média  $\pm$  SD. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

A Figura 50 ilustra o efeito das plantas de tabaco transgênicas no peso médio das larvas de *H. virescens*, após 7 dias de inoculação. Embora recém começado o experimento já foi possível observar diferenças no desenvolvimento das larvas alimentadas com plantas transgênicas. A Figura 51 ilustra os resultados deste experimento após 16 dias de tratamento. Corroborando os dados do gráfico apresentado na Figura 49, as larvas alimentadas com plantas transgênicas S2 e G1 tiveram o seu desenvolvimento comprometido. Além desta diferença no peso podemos observar que a larva alimentada com planta controle apresenta uma coloração mais escura do que as larvas submetidas aos tratamentos com plantas transgênicas.

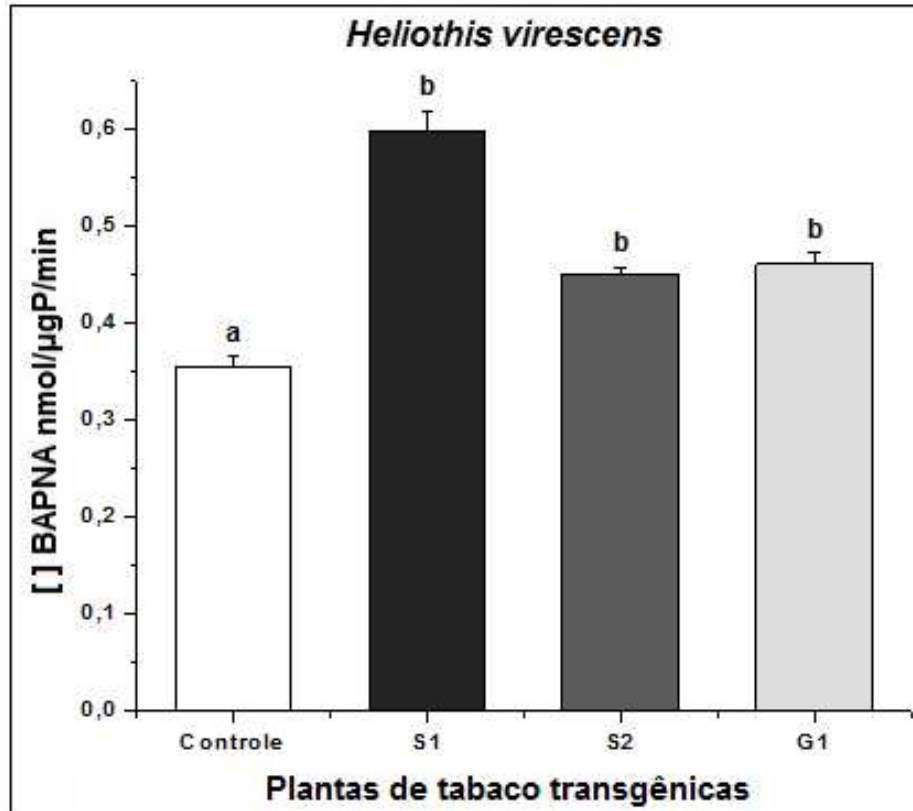


**Figura 50:** Fotos das larvas de *H. virescens* alimentadas em folhas de tabaco transgênicas após 7 dias de inoculação. Controle: larvas alimentadas com folhas não transformadas; S1 e S2: larvas alimentadas com folhas transgênicas contendo o gene *ilti-s*; G1: larvas alimentadas com folhas transgênicas contendo o gene *ilti*.



**Figura 51:** Fotos ilustrando a variação no tamanho das larvas de *H. virescens* com 16 dias após inoculação em folhas de tabaco transgênicas. (A) Linha C: larva alimentada com folhas de tabaco não transformadas; Linha S1 e S2: larvas alimentadas com folhas de tabaco transgênicas contendo o gene *ilti-s*. Linha G1: larva alimentada com folhas de tabaco transgênicas contendo o gene *ilti*.

Ensaio tríptico foi realizado para avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo das larvas alimentadas com folhas de plantas transgênicas G1, S1 e S2 quando comparadas com o controle. As enzimas presentes no intestino médio das larvas alimentadas com folhas controle e com folhas transgênicas tiveram sua atividade avaliada através da hidrólise do substrato BAPNA. Foi verificado um aumento de 68.6%, 27% e de 29.8% na atividade tríptica das larvas alimentadas com as plantas transgênicas S1, S2 e G1, respectivamente (Figura 52) quando comparadas com o controle.



**Figura 52:** Resposta das proteinases do intestino médio de larvas de *H. virescens* à ingestão de plantas de tabaco transgênicas contendo os genes *ilti-s* e *ilti*. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo (ANOVA, teste de Tukey).

## VII - DISCUSSÃO

Inibidores de tripsina produzidos por plantas são considerados agentes antimetabólicos de insetos já que interferem no processo de degradação das proteínas no intestino médio destes organismos causando deficiência proteica e influenciando assim no seu crescimento e desenvolvimento (RYAN, 1990). Este retardo no crescimento prolonga o período em que esses herbívoros estão susceptíveis a predadores (HARTL *et al.*, 2010). O potencial uso destas proteínas no controle de insetos-praga tem sido amplamente explorado com resultados satisfatórios (DUAN *et al.*, 1996).

Neste estudo, foi testada a atividade inseticida de um inibidor de tripsina de *Inga laurina* (ILTI) através da sua incorporação em dieta artificial para a broca da cana *D. saccharalis* e a praga do tabaco *H. virescens*. Quando incorporado em dieta artificial a uma concentração de 0,1% para *D. saccharalis*, ILTI não influenciou na sobrevivência das larvas, mas ocasionou uma diminuição de 51% no peso médio larval (Figura 18A e B). Em relação às larvas de *H. virescens* que se alimentaram em uma dieta artificial contendo 0,5% de ILTI, foi verificado uma redução de 84% no peso das larvas e a sobrevivência não foi alterada quando comparada com as larvas que se alimentaram em dieta controle (Figura 19A e B). Os resultados aqui apresentados mostram que ILTI exerce atividade antinutricionais contra *D. saccharalis* e *H. virescens*. Resultados similares têm sido relatados para outros inibidores. Um inibidor de sementes de *Adenantha pavonina* adicionados à dieta artificial a uma concentração de 0,1% reduziu o peso larval de *D. saccharalis* em 67% (SILVA *et al.*, 2011). Inibidores de quimiotripsina isolados de feijão (*Psophocarpus tetragonolobus*) causaram uma redução significativa no crescimento de larvas de *Helicoverpa armigera* após estas serem alimentadas em dieta artificial contendo os inibidores (TELANG *et al.*, 2009). As concentrações de ILTI utilizada nestes bioensaios correspondem aos níveis em sementes de leguminosas e foram semelhantes aos utilizados em outros estudos (BABU e SUBRAHMANYAM, 2010).

A susceptibilidade e estabilidade de ILTI em relação à ação de enzimas proteolíticas presentes nos homogenatos intestinais de *D. saccharalis* e *H. virescens* foram examinadas. ILTI foi resistente à proteólise quando incubadas com as proteinases do intestino médio de larvas do quarto ínstar de *D. saccharalis* e *H. virescens* (Figura 20A e B). Um resultado semelhante também foi encontrado para DrTI (inibidor de tripsina de



sementes de *Delonix regia*), quando a sua digestibilidade foi testada contra enzimas tripsina-like do intestino médio de larvas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* (MACEDO *et al.*, 2009). Insetos também secretam proteinases que são capazes de digerir o inibidor (GIRARD *et al.*, 1998a, 1998b; GIRI *et al.*, 1998; MICHAUD, 1997). Os resultados com ILTI são promissores, uma vez que as proteínas que são resistentes à digestão por proteinases são mais eficazes no controle de insetos (HARSULKAR *et al.*, 1999; TELANG *et al.*, 2003). Esta resistência do inibidor à digestão pelas enzimas do intestino do inseto é o primeiro pré-requisito para que a proteína exerça seus efeitos antinutricionais.

Após o ensaio de alimentação, a atividade da tripsina foi avaliada nos extratos do intestino e fezes das larvas, com o intuito de analisar o efeito da presença de ILTI na dieta. As larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens* alimentadas em dieta contendo ILTI tiveram uma redução nas taxa de crescimento, no entanto, a atividade trípica presente no intestino médio foi similar à encontrada nas larvas que se alimentaram em dieta controle (Figura 23A e 24A). Broadway e Duffey (1986) observaram um efeito semelhante em relação ao crescimento de *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua*, depois que estas espécies foram alimentadas em uma dieta suplementada com dois inibidores de tripsina. Eles observaram uma redução significativa na taxa de crescimento destas pragas, no entanto a atividade trípica no intestino médio não foi reduzida. Similar à conclusão obtida por Broadway e Duffey, nossos resultados também sugerem que a redução na taxa de crescimento dos insetos esteja relacionada à superexpressão de enzimas digestivas, de modo a compensar o efeito inibitório de ILTI. Como consequência, há uma diminuição na disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas necessárias para o desenvolvimento dos insetos.

Em relação à atividade trípica nas fezes, as duas espécies de insetos que foram alimentadas em dieta artificial contendo ILTI exibiram um perfil diferente em comparação com os grupos controle correspondentes. A atividade trípica nas fezes de *D. saccharalis* foi menor que a do grupo controle (Figura 23B), enquanto que a atividade trípica nas fezes de *H. virescens* foi maior (Figura 24B). É possível que as diferenças entre os padrões de resposta ocorreram devido à existência de mecanismos de interação inibidor-intestino médio diferentes, em ambos os insetos. O intestino médio dos insetos é onde

ocorre a maior parte da digestão e a absorção dos alimentos. Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido por uma estrutura acelular quitinosa, a membrana peritrófica (MP), que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico. Entre as espécies pode haver diferenças na composição bioquímica da MP (TELLAN, 1996) sugerindo que esta tem sofrido pressão evolutiva para se adequar ao tipo de alimentação (LEHANE, 1997). Uma das principais funções da MP é atuar no mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas, fenômeno conhecido como circulação ecto-endoperitrófica (TERRA, 2001). Macedo e colaboradores (2002) relataram que DMTI-II, um inibidor de tripsina de sementes isoladas de *Dimorphandra mollis*, interagiu com a quitina da membrana peritrófica do intestino médio de *Callosobruchus maculatus*. Uma explicação plausível para os nossos resultados pode ser que ambos os insetos apresentam diferenças na constituição de suas membranas intestinais promovendo uma interação diferencial com o inibidor. O resultado desta interação pode ser uma perturbação na membrana peritrófica que poderia (i) dificultar o processo de reciclagem das enzimas, fazendo com que sua quantidade seja aumentada nas fezes ou (ii) o inibidor pode se ligar à enzima formando um complexo cujo tamanho dificultaria a passagem para o espaço ectoperitrófico, indo assim parar nas fezes. No caso de *H. virescens*, pode estar ocorrendo interação do inibidor com componentes da membrana peritrófica aumentando assim a atividade de tripsina nas fezes. Já em relação às larvas de *D. saccharalis*, ILTI não estaria interagindo com a membrana. O inseto poderia estar retendo suas enzimas no intestino para tentar sobrepujar o efeito do inibidor.

Analisando o efeito de ILTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas verificamos que ILTI, quando incorporado em dieta artificial, não alterou o consumo da dieta, mas fez diminuir a produção fecal das larvas de *D. saccharalis* (Figura 21). Já em relação às larvas de *H. virescens* alimentadas em dieta contendo ILTI, houve uma diminuição tanto na dieta consumida como nas fezes produzidas (Figura 22). Larvas alimentadas com ILTI tiveram seu metabolismo alterado como podemos verificar nas Tabelas 5 e 6. Os índices ECD e CM foram afetados para ambos os insetos. O ECD diminuiu à medida que a proporção de alimento digerido é metabolizado para gerar energia (COELHO *et al.*, 2007). Na dieta contendo ILTI o índice ECD foi menor, significando, portanto, que uma menor quantidade de alimento foi utilizada para a produção de

biomassa do inseto, o que justifica o menor peso larval. Este resultado está de acordo com o aumento do custo metabólico destas larvas. Para larvas de *H. virescens*, também foi observado efeito sobre os índices ECI e AD. O ECI representa a capacidade do inseto em utilizar o alimento ingerido para o crescimento. Uma diminuição no ECI sugere que uma maior quantidade de alimento está sendo metabolizado para energia e pouco está sendo convertido em biomassa, provavelmente para tentar contornar o efeito antinutricional de ILTI. O aumento do índice AD observado para as larvas alimentadas em dieta contendo ILTI foi provavelmente um resultado da baixa produção de fezes por estas larvas quando comparado com o grupo controle. Este fato também foi observado por Mordue (Luntz) e Blackwell (1993) e Rayapuram e Baldwin (2006).

Verificamos também a atividade anti-trípica das enzimas do intestino desses insetos depois de alimentados com o inibidor, para avaliarmos se o inseto continuava sofrendo os efeitos de ILTI. Os resultados mostraram que as enzimas dessas larvas continuavam sensíveis à ação de ILTI (Figura 25A e B), sugerindo que nenhuma nova enzima proteolítica resistente ao inibidor foi induzida nas larvas alimentadas em dieta contendo ILTI. Brioschi e colaboradores (2007) verificaram que *S. frugiperda* já na primeira geração foi capaz de se adaptar ao inibidor de soja por meio da produção de novas enzimas insensíveis ao inibidor. Entretanto, nossos resultados mostraram que *D. saccharalis* e *H. virescens* não foram capazes de se adaptarem a presença de ILTI, pelo menos até o quarto ínstar da primeira geração. Estes experimentos sugerem que ILTI é um candidato promissor para o controle destas duas pragas.

Para avaliarmos o potencial uso deste inibidor, sua eficácia também foi testada em relação a outras espécies de insetos-praga. ILTI foi testado *in vitro* contra as proteinases presentes no intestino médio de três diferentes pragas, *S. frugiperda* (praga do milho), *A. ipsilon* (praga de muitos cereais importantes) e *T. absoluta* (praga do tomate), todos pertencentes à ordem Lepidoptera (Figura 26). A atividade inibitória de ILTI foi eficaz contra as enzimas tripsina-like extraídas das larvas destas espécies de insetos, sugerindo que ILTI poderá afetar o desenvolvimento larval dessas pragas quando incorporado em dieta artificial.

Durante a última década, a utilização de culturas transgênicas tem sido crescente, especialmente com a descoberta de genes eficazes de plantas que podem ser transferidos

entre as culturas e oferecer resistência contra pragas e patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Genes de IPs, isolados de diferentes espécies vegetais, têm sido transferidos para diversas plantas de interesse econômico, resultando em plantas transgênicas resistentes ao ataque de insetos (BOULTER, 1993). O gene *ilti* foi isolado a partir do DNA genômico de *I. laurina* e clonado em um vetor de expressão a fim de avaliarmos o potencial de ILTI como um candidato para a produção de plantas resistentes as pragas da ordem Lepidoptera. Obtivemos a sequência de nucleotídeos completa do gene *ilti*, permitindo assim realizar a clonagem do gene e expressão da proteína em sistema de expressão heterólogo e a sua caracterização funcional. A estratégia de utilização de *primers* degenerados para a amplificação do gene por PCR demonstrou ser eficaz para sobrepujar as dificuldades de clonagem de um novo gene, quando a biblioteca de cDNA ou genômica não estão disponíveis. A sequência de aminoácidos deduzida de ILTI, determinada utilizando a sequência do gene *ilti* amplificado a partir do DNA genômico, foi similar a sequência de aminoácido da proteína nativa de sementes, sequenciada por Macedo e colaboradores 2007, indicando que esta região do DNA genômico não possui sequências de intervenção, o gene *ilti*, portanto, não possui íntrons (Figura 27A e B). Este resultado foi similar aos resultados obtidos a partir de outros inibidores tipo Kunitz que são desprovidos de íntrons. O gene obtido a partir do DNA genômico de soja (*Glycine max*) que codifica um inibidor de tripsina tipo Kunitz (SKTI) foi relatado ser um gene sem íntron (SONG *et al.*, 1993). Outro relato similar foi observado por Roy e Dutta, (2009), isolaram um gene do feijão que codifica um inibidor de quimiotripsina-tripsina tipo Kunitz (WbCTI) e este também não apresentou íntron. A sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene *ilti* amplificado está de acordo com a sequência de aminoácido relatada de ILTI nativo extraída de sementes de *I. laurina*, exceto pela ausência de dois resíduos de aminoácidos, Lys e Tyr, localizados entre os resíduos Val 95 e Lys 98 da sequência de aminoácidos de ILTI nativa. Essas diferenças entre a sequência da proteína nativa e a sequência de aminoácidos deduzida a partir do DNA genômico sugerem que *I. laurina* pode conter diversos genes relacionados com inibidor de tripsina, tais como aqueles descrito para os inibidores de tripsina de soja (*Glycine max*) (SONG *et al.*, 1993; GOTOR *et al.*, 1995) e o inibidor de tripsina de *D. regia* (HUNG *et al.*, 2007 ).

Em relação à proteína expressa em bactéria (reILTI) esta provou ser tão eficaz na inibição da atividade da tripsina bovina quanto a proteína nativa (Figura 30A). Além disso, reILTI foi capaz de inibir as enzimas tripsina-like do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens* (Figura 30B). Nesse experimento *in vitro* em relação às proteinases presentes no intestino médio das larvas, reILTI mostrou uma moderada e uma forte inibição em relação às proteinase de *D. saccharalis* e *H. virescens*, respectivamente. Este perfil da atividade anti-tríptica de reILTI foi semelhante àquele observado para a proteína ILTI nativa quando esta foi testada *in vitro* em relação as proteinases presentes no intestino médio de larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens* (ver linha controle na Figura 25A e B, respectivamente). No entanto, quando ILTI foi testado em dieta artificial e fornecido a essas larvas, ele afetou o desenvolvimento dos insetos, verificado pela drástica redução no peso dessas larvas. Com base nestes resultados, sugerimos que reILTI poderá exercer uma atividade antinutricional quando incorporada em dieta artificial.

Como abordado anteriormente, a contínua necessidade de aumentar a produção de alimentos requer o desenvolvimento e a aplicação de ferramentas biotecnológicas inovadoras capazes de oferecerem variedades de culturas melhoradas, oportuna e economicamente rentáveis (HAQ *et al.*, 2004). A transformação de plantas com genes de inibidores enzimáticos no combate de insetos-praga ganha força. Muitos pesquisadores defendem seu uso por constituir uma estratégia de defesa utilizada extensivamente pelas plantas (THOMAS *et al.*, 1995; BABU *et al.*, 2003). Neste trabalho demonstramos que ILTI, quando incorporado em dieta artificial, afeta o desenvolvimento de *D. saccharalis* e *H. virescens* sugerindo que este inibidor tem potencial para proteger as plantas de cana-de-açúcar e tabaco contra os danos causados por estes insetos.

Para avaliarmos o potencial do inibidor em estudo como uma ferramenta biotecnológica procedeu-se à transformação da cana-de-açúcar com o gene sintético (*ilti-s*) via biobalística. Esta técnica foi escolhida por ser um dos principais métodos para transformação de cana (MOORE, 1999). Além disso, é um procedimento bem estabelecido no laboratório onde foi realizado o experimento (CEBTEC-ESALQ). A transformação de cana-de-açúcar com o gene *ilti-s* foi realizada com sucesso, gerando plantas resistentes à marca de seleção do vetor co-transformado (geneticina). Das 54 plantas regeneradas, 22 foram confirmadas quanto à integração do *ilti-s* no genoma

vegetal, amplificando um fragmento de 636 pb (Figura 33). Dentre essas plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene *ilti-s*, 6 foram selecionadas para análise quanto à expressão gênica. Nossos experimentos mostraram que as 6 plantas transformadas analisadas expressaram o gene *ilti-s* (Figura 36).

Posteriormente, foi analisado o efeito de quatro destas plantas de cana transgênicas em relação ao desenvolvimento de *D. saccharalis*. Em condições naturais, as larvas de *D. saccharalis* vivem na folha de cana até o segundo ínstar, depois penetram no colmo e ficam até completarem seu ciclo de vida (MENDONÇA *et al.*, 1996). Apesar das larvas de *D. saccharalis* não completarem seu ciclo de vida no tecido foliar, elas vivem por um longo tempo neste tecido, tornando-se viável a utilização deste material vegetal para nossos ensaios biológicos. A finalidade do nosso trabalho é obter um transgênico capaz de afetar o desenvolvimento das larvas de *D. saccharalis* já que o inibidor se ligaria na tripsina do intestino do inseto impedindo a degradação das proteínas ingeridas. Falco e colaboradores (2003) em um experimento com plantas de cana-de-açúcar transgênicas expressando inibidores de proteinases de soja verificaram que as larvas de *D. saccharalis* alimentadas com folhas transgênicas tiveram um atraso no seu desenvolvimento quando comparado com as larvas que se alimentaram em folhas não transformadas. Para avaliar a eficiência do nosso transgênico, foi determinado o peso médio das larvas e a atividade trípica do intestino larval. Os resultados mostraram diferenças no desenvolvimento das larvas alimentadas com folhas transgênicas. Das quatro plantas transgênicas analisadas, duas delas (plantas 2 e 3) exerceram um efeito negativo no crescimento das larvas mostrando uma redução significativa no peso médio das mesmas. Entretanto, o efeito das outras duas plantas transgênicas (1 e 4) foi oposto verificando-se um aumento no peso médio larval (Figura 38). Além dos efeitos de retardo do crescimento larval, alguns trabalhos tem relatado que as larvas dos insetos são capazes de se adaptar à presença de inibidores mediante a produção de novas proteases insensíveis aos inibidores na tentativa de compensar as enzimas inibidas. Estas larvas exibem aumento na taxa de ingestão de alimento e um maior desenvolvimento do que as larvas controle (JONGSMA *et al.*, 1995; GIRARD *et al.*, 1998; CLOUTIER *et al.*, 1999; LECARDONNEL *et al.*, 1999). Abdeen e colaboradores (2005) observaram que larvas de *Heliothis obsoleta* alimentadas com plantas de tomate transgênicas expressando baixos níveis de dois inibidores de

proteínases foram capazes de se adaptarem mediante a superprodução de uma nova classe de proteínas resistentes aos inibidores. Os autores relacionaram este aumento das enzimas digestivas com um aumento de crescimento observado nessas larvas. Estas observações explicariam o aumento do peso das larvas alimentadas com as plantas transgênicas 1 e 4.

Alternativamente, a diferença observada nos efeitos das plantas transgênicas com o gene *liti-s* no desenvolvimento das larvas de *D. saccharalis* poderia estar relacionada aos níveis de expressão do inibidor e/ou à produção da proteína ativa. Larvas alimentadas com plantas transgênicas expressando altos níveis do inibidor teriam um retardo no crescimento. Está bem documentado que a expressão do transgene depende da região de inserção no genoma vegetal, do número de cópias inseridas e da sua integridade após a inserção (PICELLI, 2010). Regiões centroméricas, intergênicas e de heterocromatina, por exemplo, apresentam baixa atividade gênica por serem locais onde a cromatina encontra-se altamente condensada. No entanto, a eucromatina, onde a cromatina se encontra mais desespiralada, facilita o acesso dos agentes reguladores da transcrição mostrando mais eficiência na expressão dos genes inseridos neste local do genoma (PICELLI, 2010). Apesar da transformação genética via biobalística ser a principal metodologia empregada na introdução de transgenes em cana-de-açúcar, as plantas transgênicas produzidas mostram grande variação na expressão do transgene (LAKSHMANAN *et al.*, 2006). Altpeter e colaboradores (2005) relataram que baixo número de cópias do transgene no genoma vegetal está relacionado com altos níveis de expressão. Entretanto cada cassete de expressão deve estar intacto, isto é, não sofrer rearranjos ou fragmentação anteriormente à integração. Kohli e colaboradores (1999) mostraram que a presença de uma ou mais cópias rearranjadas podem potencialmente levar ao silenciamento gênico, mesmo se outras cópias estão intactas ou funcionais. Para investigar quais das situações citadas acima estariam, de fato, relacionadas com a diferença de efeito de *liti-s* no desenvolvimento de larvas de *D. saccharalis* estão sendo realizados novos experimentos (i) Southern Blot para determinar o número de cópias do transgene inserido no genoma vegetal e (ii) PCR em tempo real para avaliar quantitativamente os níveis de expressão de *liti-s* nas plantas transgênicas. Outro fator importante a ser considerado é o fato que a verificação da expressão do transgene não garante que a proteína está sendo produzida.

Por esta razão é fundamental avaliar a presença da proteína ILTI-s no extrato de proteínas totais de folhas das plantas transgênicas. Com este intuito, foi produzido em coelho um anticorpo policlonal anti-ILTI. Estamos em fase de padronização da extração de proteínas para o desenvolvimento do experimento.

O ensaio tríptico foi realizado para avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo das larvas que se alimentaram com plantas transgênicas. As enzimas presentes no intestino médio das larvas alimentadas com folhas controle e com folhas transgênicas tiveram sua atividade avaliada através da hidrólise do substrato BAPNA. As larvas alimentadas com as plantas transgênicas 1, 2 e 4 não mostraram alterações no perfil enzimático do intestino quando comparadas com o controle. Entretanto foi verificado um aumento (estatisticamente significativo) de 9,8% na atividade tríptica das larvas alimentadas com a planta transgênica 3 (Figura 41). Este aumento nos níveis de enzimas digestivas estaria diretamente relacionado com a diminuição do crescimento como proposto por Gatehouse e colaboradores (1992).

Além de verificar o potencial de *ilti-s* no desenvolvimento de larvas de *D. saccharalis* mediante a obtenção de cana-de-açúcar transgênica, plantas de tabaco foram transformadas com os genes *ilti* e *ilti-s*, via *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação de plantas de tabaco com os genes em estudo foi bem sucedida (Figura 45). Três plantas transgênicas, duas expressando o gene *ilti-s* (S1 e S2) e uma expressando o gene *ilti* (G1), foram avaliadas em relação ao desenvolvimento de *H. virescens*. Houve uma redução de 51% no peso médio das larvas alimentadas com folhas de tabaco transgênicas S2 e G1 quando comparadas com as larvas que se alimentaram com folhas não transformadas (Figura 49). Os resultados mostraram que o gene *ilti* amplificado a partir do DNA genômico de *I. laurina* foi igualmente eficiente ao gene sintético (*ilti-s*) com uso de códons da cana-de-açúcar na diminuição do crescimento de larvas de *H. virescens*. Estes experimentos também sugerem que o peptídeo sinal não seria fundamental para o correto enovelamento da proteína e para sua atividade biológica.

Os mesmos efeitos de redução de crescimento de larvas alimentadas com plantas de tabaco transgênicas expressando inibidores de proteinases foram relatados por outros autores. Johnson e colaboradores (1989) expressaram um inibidor de proteinase de tomate II em plantas de tabaco e observaram um retardo no crescimento das larvas de



*Manduca sexta* que se alimentaram com folhas das plantas transgênicas. Marchetti e colaboradores 2000 expressaram um inibidor de soja tipo Kunitz em plantas de tabaco e verificaram redução no peso médio larval de *Spodoptera littoralis*. Foi avaliada também a atividade trípica no extrato do intestino médio das larvas de *H. virescens*. Foi verificado um aumento na atividade trípica das larvas alimentadas com as plantas transgênicas S1, S2 e G1 (Figura 52). Como explicado para larvas de *D. saccharalis*, a redução na taxa de crescimento de *H. virescens* alimentadas com plantas transgênicas pode estar relacionada com uma superexpressão das enzimas digestivas de modo a compensar o efeito inibitório de ILTI. Está relatado também que a expressão do inibidor pode levar ao retardo do desenvolvimento do inseto (ABDEEN *et al.*, 2005). Segundo mostrado na Figura 51, as larvas alimentadas com as plantas transgênicas G1, S1 e S2 apresentam uma coloração mais clara do que a larva controle. Pode se observar que *H. virescens* sofre um escurecimento do tegumento durante o desenvolvimento. Por esse motivo, sugerimos que a larva controle, visivelmente mais escura, poderia estar em ínstar de desenvolvimento maior do que as larvas submetidas aos diversos tratamentos.

Além dos efeitos no desenvolvimento larval, plantas transgênicas expressando inibidores de proteinases podem afetar a sobrevivência dos indivíduos. Abdeen e colaboradores (2005) verificaram que larvas de *H. obsoleta* alimentadas com folhas de tomate transgênicas expressando dois inibidores de proteinases apresentaram um aumento de 30,4% na taxa de mortalidade quando comparadas com o controle. Este parâmetro não foi avaliado para larvas de *D. saccharalis* por dois motivos (i) elevado número de indivíduos utilizados no experimento e (ii) complexidade experimental dado o tamanho das larvas, como descrito anteriormente. Neste trabalho verificamos a sobrevivência de larvas de *H. virescens* submetidas aos diversos tratamentos. Os resultados mostraram uma redução na sobrevivência das larvas que se alimentaram com folhas de tabaco transgênicas S1 e G1 quando comparadas com as larvas que se alimentaram com folhas de tabaco não transformadas. As larvas alimentadas com plantas S1 mesmo não mostrando alterações significativas no peso, apresentaram uma taxa de mortalidade de 62% sugerindo que o transgênico produziu um efeito nocivo para a maioria das larvas. Entretanto, as larvas sobreviventes conseguiram se adaptar à presença do inibidor provavelmente pela superexpressão de enzimas digestivas (Figura 52).

É importante ressaltar que foram observados efeitos similares do inibidor ILTI sobre o desenvolvimento de *D.saccharalis* e *H. virescens* quando alimentadas tanto com dieta artificial suplementada com esta proteína quanto com plantas transgênicas contendo o gene em estudo. Os resultados obtidos usando plantas transgênicas são preliminares devido à necessidade de fazer uma caracterização molecular mais detalhada destas plantas, repetir as análises experimentais aumentando o número de tratamentos e de indivíduos e realizar testes em casa de vegetação. No entanto, consideramos que conseguimos resultados importantes que sugerem que a utilização de plantas transgênicas contendo o inibidor ILTI pode ser uma estratégia promissora no controle das pragas testadas.

## VIII - CONCLUSÕES

- ✓ A proteína ILTI é um bom candidato para o uso no controle de insetos-praga por três razões fundamentais:
  1. Propriedade antinutricional do inibidor de tripsina purificado de sementes de *I. laurina* verificada em relação às larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens*;
  2. ILTI mostrou resistência à digestão por proteinases presentes no intestino dos insetos testados;
  3. Os insetos alimentados com dieta artificial contendo ILTI não mostraram adaptação a este inibidor até a primeira geração;
- ✓ Geramos uma potencial ferramenta biotecnológica mediante a elucidação da sequência do gene *ilti*, a demonstração de que esse gene é expresso de forma funcional em bactérias e que a proteína recombinante pode ter efeito inibitório.
- ✓ Plantas transgênicas de tabaco e cana-de-açúcar foram capazes de interferir no metabolismo dos insetos-praga testados sugerindo que esta estratégia pode ser promissora na obtenção de plantas mais resistentes ao ataque de insetos.

## IX- PERSPECTIVAS

- ✓ Caracterização molecular das plantas transgênicas obtidas. Estas análises incluem determinação do número de cópias do transgene e análise de expressão quantitativa nos diversos transformantes.
- ✓ Identificação da proteína ILTI em extrato de proteínas totais de folhas de plantas transgênicas mediante a técnica de *Western Blot* utilizando anticorpo policlonal anti-ILTI.
- ✓ Realização de testes das plantas transgênicas em casa de vegetação com o intuito de avaliar sua resistência ao ataque dos insetos-pragas.

## X - REFERÊNCIAS

- ABDEEN, A.; VIRGOS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILES, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Mol. Biol.*, 57: 189-202. 2005.
- AFUBRA (Associação do Fumicultores do Brasil, <http://www.afubra.com.br>, August, 2005.
- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*, 5 edição: Academic Press, 635p. 2005.
- ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P.J.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLI, A.; MOOIBROEK, H.; NICHOLSON, L.; NGUYEN, T.T.; NUGENT, G.; RAEMAKERS, K.; ROMANO, A.; SOMERS, D.A.; STOGER, E.; TAYLOR, N.; VISSER, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, 15: 305-327. 2005.
- ANDREWS, R.E.; FAUST, R.M.; WABIKO, H.; RAYMOND, K.C.; BULLA, L.A. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 6: 163-232. 1987.
- ARENCIBIA, A.; VÁZQUEZ, R.; PRIETO, D.; TÉLLEZ, P.; CARMONA, E.; COEGOI, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding*, 3: 247-255. 1997.
- ARRUDA, L.H. Caracterização estrutural da interação de serino proteinases de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e inibidores de plantas. Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Agronomia da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2011.
- ARVINTH, S.; ARUN, S.; SELVAKESAVAN, R.K.; SRIKANTH, J.; MUKUNTHAN, N.; KUMAR, A.P.; PREMACHANDRAN, M.N.; SUBRAMONIAN, N. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. *Plant Cell Rep.*, 29: 383-395. 2010.
- BABU, R.M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management - an over view. *Crop Protection*, 22: 1071-1086. 2003.
- BABU, S.R. e SUBRAHMANYAM, S. Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pest Biochem. Physiol.*, 98: 349-358. 2010.
- BARBOSA, A.L. Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares visando transformação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
- BENFEY, P.N.; REN, L.; CHUA, N.H. Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.*, 6:1685-1696. 1990

- BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32: 156-173. 2000.
- BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comp. Bioch. and Physiol.*, 145: 669-677. 2007.
- BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 297-326. 1997.
- BIRK, Y. *Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering*. Springer-Verlag, 1-170. 2003.
- BONATO, A.A. Entrevista online. <http://www.ihu.unisinos.br/entrevistas/34729-o-paradoxo-da-producao-e-do-consumo-de-fumo-no-brasil-entrevista-especial-com-amadeu-bonato>. 2010
- BONNING, B.C. *Biotechnology and Insects*. In: *Encyclopedia of Insects*, RESH, V.H.; CARDÉ, R.T. Academic Press, 120-123. 2003.
- BOULAY, R.; FEDRIANI, JM.; MANZANEDA, A.J.; CERDA, X. Indirect effects of alternative food resources in an ant-plant interaction. *Oecologia*, 144: 72-79. 2005.
- BOULTER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Biochemistry*, 34: 1453-1466. 1993.
- BOWER, R. e BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant Journal*, 2: 409-416. 1992.
- BOWER, R.; ELLIOT, A.R.; POTIER, B.A.M.; BIRCH, R.G. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Molecular Breeding*, Dordrecht, 2: 239-249. 1996.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254. 1976.
- BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of New Seeds*, 5: 209-222. 2003.
- BRASILEIRO, A.C.M. e DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.B. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 2: 863p. 1999.
- BRIOSCHI, d.; NADALINI, L.D.; BENGTON, M.H.; SOGAYAR, M.C.; MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 1283-1290. 2007

- BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 128: 365-375. 2001.
- BROADWAY, R.M. e DUFFEY, S.S. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32: 673-680. 1986.
- BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 41: 107-116. 1995.
- BUTTERFIELD, M.K.; IRVINE, J.E.; GARZA, M.V.; MIRKOV, T.E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 797-803. 2002.
- CAMARGO, S.R. Identificação de genes e uso de promotores modulados por etanol em cana-de-açúcar. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas. 2007.
- CARLINI, C.R. e GROSSI-DE-SA, M.F. Plant proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515-1539. 2002.
- CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. *The Plant Cell Reports*, 11: 494-498. 1992.
- CHRISTENSEN, A.H. e QUAIL, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.*, 5: 213-218. 1996.
- CLOUTIER, C.; FOURNIER, M.; JEAN, C.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Growth compensation and faster development of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on potato foliage expressing oryzacystatin I. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 40: 69-79. 1999.
- COELHO, M.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 146: 406-414. 2007.
- COMAI, L.; FACCIOTTI, D.; HIATT, W.R.; THOMPSON, G.; ROSE, R.E.; STALKER, D.M. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744. 1985.
- CRUZ, I.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Pragas. Sistema de Produção, Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/prvegetativa.html>. Acesso em: 4 maio 2007. 2005.
- DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current status, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica*, 71: 1-14. 1993.

DE LEO, F., BONADÉ-BOTTINO, M.A., CECI, L.R., GALLERANI, R., JOUANIN, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 118: 997-1004. 1998.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOAUNIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 593- 602. 2001.

DONG, Q.; LAWRENCE, C.J.; SCHLUETER, S.D.; WILKERSON, M.D.; KURTZ, S.; LUSHBOUGH, C.; BRENDEL, V. Comparative Plant Genomics Resources at PlantGDB. *Plant Physiology*, 139: 610-618. 2005.

DOYLE, J.J. e DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15. 1990.

DUAN, X.L.; LI, X.G.; XUE, Q.Z.; ABOELSAAD, M.; XU, D.P.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato protease inhibitor II gene are insect resistant. *Nat. Biotechnol.*, 14: 494–498. 1996.

DUNG, T.; DUC, L.; HO, N.; UYEN N. Agrobacterium-mediated transformation of CRY1Ac gene to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and evaluation of *Heliothis armigera* resistance. *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*. 2006.

DUNSE, K.M.; STEVENS, J.A.; LAY, F.T.; GASPAR, Y.M.; HEATH, R.L.; ANDERSON, M.A. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *PNAS*, 107: 15011–15015. 2010.

EHRlich, P.R. e RAVEN, P.H. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18: 586-608. 1964.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95: 271-278. 1961.

FALCO, M.C. Transformação de cana-de-açúcar para resistência do herbicida glufosinato de amônio via biolística. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1998.

FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.T.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. *The Plant Cell Reports*, 19: 1188-1194. 2000.

FALCO, M.C.; MARBACH, A.S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genetics and Molecular Biology*, 24: 113-122. 2001.

FALCO, M.C. e SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 761-766. 2003.

FAN, S.G. e WU, G.J. Characteristics of plant protease inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 46: 273-292. 2005.



FARRAR, R.R.; BARBOUR, J.D.; KENEDY, G.G. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 82: 593–598. 1989.

FELIX, J.M. Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas, 162p. 2006.

FERREIRA, M.G.R.; CARVALHO, C.S.H.; CARNEIRO, A.A.; CÁRDENAS, F.E.N. Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schumm.) usando biobalística. *Ciência rural*, 34: 279-280. 2004.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Agrianual 2010: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 155-161. 2004.

FITCH, M.; DE LA CRUZ, A.; MOORE, P. Effectiveness of different selection markers for sugarcane transformation. In: International Plant Genome Conference, Plant Genomell: proceedings, 57p. 1995.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.*, 34: 17-52. 1989.

FLEMING, P.A.; HOFMYER, S.D.; NICOLSON, S.D. Role of insects in the pollination of *Acacia nigrescens* (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 73: 49-55. 2007.

FORTUNATO, F.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; BRUMANO, M.H.N.; SILVA, C.H.O.; GUEDES, R.N.C.; MOREIRA, M.A.M. Lipxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hubner). *Journal of Pest Science*, 4: 241-247. 2007.

FRANCO, O.C.; MELO, F.R.; SILVA, M.C.M.; GROSSI DE SÁ, M.F. Resistência de plantas a insetos: Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, 2: 36-40. 1999.

FRIZZAS, M.R.; CUNHA, U.S.; MACEDO, L.P.M. Plantas transgênicas resistentes a insetos. *R. bras. Agrociência*, 10: 13-18. 2004.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. *Entomologia Agrícola*, v. 10 FEALQ. 2002.

GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; HILDER, V.A. Potential of plant derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: Gatehouse, A.R., Hilder, V.A., Boulter, D. (Eds.), *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. CAB International, 155-181. 1992.

GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pesticide Science*, 52: 165-175. 1998.

GATEHOUSE, J.A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Curr. Prot. Pep. Sci.* 5: 409-416. 2011.

GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITING, B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 3: 327-333. 1990.

GILLOT, C. *Entomology*, second edition. Plenum Press, New York, 798p. 1995.

GIRARD, C.; LE METAYER, M.; BONADE-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 229–237. 1998a.

GIRARD, C.; LE METAYER, M.; ZACCOMER, B.; BARTLET, E.; WILLIAMS, I.; BONADE-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.H.; JOUANIN, L. Growth stimulation of beetle larvae reared on transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. *J. Insect Physiol.*, 44: 263-270. 1998b.

GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; DESHPANDE, V.V.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiol.*, 116: 393–401. 1998.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701-726, 1998.

GOMES, C.E.M. Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida*. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2004.

GOTOR, C.; PINTOR-TORO, J.A.; ROMERO, L.C. Isolation of a new member of the soybean Kunitz-type proteinase inhibitors. *Plant Physiol.*, 107: 1015-1016. 1995.

HAGENS, K.S.; DADD, R.H.; REESE, J. The food of insect. In: HUFFAKER, C.B.; RABB, R.L. *Ecological Entomology*. New York: Wiley, 79-112. 1984.

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.*, 431: 145-159. 2004.

HARSULKAR, A.M.; GIRI, A.P.; PATANKAR, A.G.; GUPTA, V.S.; SAINANI, M.N.; RANJEKAR, P.K.; DESHPANDE, V.V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa armigera*. *Plant Physiol.*, 121: 450-497. 1999.

HARTL, M.; GIRI, A.P.; KAUR, H.; BALDWIN, I.T. Serine proteinase inhibitors specifically defend *Solanum nigrum* against generalist herbivores but do not influence plant growth and development. *The Plant Cell*, 22: 4158-4175. 2010.

HAUPTMANN, R.M.; VASIL, V.; OZIAS-AKINS, P.; TABAEIZADEH, Z.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B.; VASIL, I.K. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae. *Plant Physiology*, 86: 602-606. 1988.

- HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160–163. 1987.
- HILDER, V.A. e BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. *Crop Protection*, 18: 177-191. 1999.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMAN, N.L.; EICH HOLSTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231. 1985.
- HUNG, C.H.; PENG, P.H.; HUANG, C.C.; WANG, H.L.; CHEN, Y.J.; CHEN, Y.L.; CHI, L.M. Genomic and cDNA cloning, characterization of *Delonix regia* trypsin inhibitor (DrTI) gene, and expression of DrTI in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71: 98-103. 2007.
- JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; GYNHEUNG, A.N.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9871-9875. 1989.
- JONGSMA, M.A., BAKKER, P.L., PETERS, J., BOSCH, D., STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 8041-8045. 1995.
- JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.*, 131: 1-11. 1998.
- KESSLER, A. e BALDWIN, I.T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 299-328. 2002.
- KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, H.P.; MOORE, R.F. *Handbook of insect rearing*. Elsevier, 265-270. 1985.
- KLEE, H.J.; HORSCH, R.B.; ROGERS, S.G. Agrobacterium mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 467-486. 1987.
- KLEIN, T.M.; GRADZILE, T.; FROMM, M.E.; SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity of microprojectiles. *Nature biotechnology*, 6: 559-563. 1987.
- KOHLI, A.; GAHAKWA, D.; VAIN, P.; LAURIE, D.A.; CHRISTOU, P. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 208: 88-97. 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. 1970.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C.P.L.; BERDING, N.; GRANT, R.; SMITH, G.R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum spp.* Interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Reports*, 25: 1007-1015. 2006.

- LAWRENCE, P.K. e KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Journal of Biotechnology*, 5: 93-109. 2002.
- LECARDONNEL, A.; CHAUVIN, L.; JOUANIN, L.; BEAUJEAN, A.; PRÉVOST, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.*, 140: 87-98. 1999.
- LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Ann. Rev. Entomol.*, 42: 525-550. 1997.
- LEIBBRANDT, N.B. e SNYMAN, S.J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. *Crop Sciences*, 43: 671-677. 2003.
- LEMOS, M.V.F. Controle biológico por *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, ano 1, nº 2, julho/agosto. 1997.
- LI, J.; BRADER, G.; PALVA, E.T. Kunitz trypsin inhibitor: an antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*, 1: 482-495. 2008.
- LINGARAJU, M.H. e GOWDA, L.R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *BBA*, 1784: 850-855. 2008.
- LIPKE, H.; FRAENKEL, G.S.; LIENER, I. Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2: 410-414. 1954.
- LOPES, A.R. Serina endopeptidases de insetos e a interação inseto-planta. Tese apresentada ao Instituto de Química para obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica) da Universidade de São Paulo. 2004.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras – Manual de identificação e Cultivo de Plantas arbóreas nativas do Brasil. *Plantarum*, 368p. 2002.
- MACEDO, M.L.R.; MATOS, D.G.G.; MACHADO, O.L.T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Trypsin inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds: Purification and Properties. *Phytochem.* 54: 553-558. 2000.
- MACEDO, M.L.R.; MELLO, G.C.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MATOS, D.G.G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 891-898. 2002.
- MACEDO, M.L.R.; GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104-1111. 2007.
- MACEDO, M.L.R.; PANDO, S.C.; CHEVREUIL, L.R.; MARANGONI, S. Properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds against digestive proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Protein Pept. Lett.*, 16: 1459-1465. 2009.
- MACEDO, M.L.R.; DURIGAN, R.A.; SILVA, D.S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta*

*kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 73: 213-231. 2010.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; FRANCO, O.L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C.F.R.; Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. Comp. Biochem. Physiol. B, 158: 164-172. 2011.

MACINTOSH, S.C.; KISHORE, G.M.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; STONE, T.B.; SIMS, S.R. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. J Agric Food Chem., 38: 1145-52. 1990.

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V.R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary bus. The Plant Cell Reports, 23: 134-143. 2004.

MARCHETTI, S.; DELLEDONNE, M.; FOGHER, C.; CHIABÀ, C.; CHIESA, F.; SAVAZZINI, F.; GIORDANO, A. Soybean Kunitz, C-II and PI-IV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. Theor. Appl. Genet., 101: 519-526. 2000.

MARON, J.L. e CRONE, E. Herbivory: effects on plant abundance, distribution and population growth. Proceedings of the Royal Society B, 273: 2575-2584. 2006.

MASCARENHAS V.J. e LUTTRELL, R.G. Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Environmental Entomology, 26: 939-945, 1997.

MCMANUS, M.T.; WHITE, D.W.R.; MCGREGOR, P G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. Transgenic Res., 3: 50-58. 1994.

MEDEIROS, A.H. Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2008.

MELOTTO-PASSARIN, D.M. Transformação genética de cana-de-açúcar por biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ. 2009.

MENDONÇA, A.F.; MORENO, J.A.; RISCO, S.H.; ROCHA, I.C.B. As brocas da cana-de-açúcar, *Diatraea* spp. (Lep., Pyralidae), in: A.F. MENDONÇA (Ed.), Pragas da cana-de-açúcar, 51-82. 1996.

MICHAUD, D. Avoiding proteinase-mediated resistance in herbivorous pests. Trends Biotechnol., 15: 4-6. 1997.

MOHAN-BABU, R.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an over view. *Crop Protection*, 22: 1071-1086. 2003.

MOORE, P.H. Progress and development in sugarcane biotechnology. *Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology*, 23: 241-258. 1999.

MORDUE (LUNTZ), A.J. E BLACKWELL, A. Azadirachtin: an Update. *J. Insect Physiol.*, 39: 903-924. 1993.

MOREIRA, L.F. Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa. 2007.

MUDGE, S.R.; OSABE, K.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M.; BIRCH, R.G. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploidy crop species. *Planta*, 229: 549-558. 2009.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497. 1962.

MURDOCK, L.L. e SHADE, R.E. Lectins and protease inhibitors as plant defense against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6605-6611. 2002.

NEHARA, N.S.; CHIBBAR, R.N.; LEUNG, N.; CASWELL, K.; MALLARD, C.; STEINHAUSER, L.; BAGA, M.; KARTHA, K.K. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues from microprojectile bombardment with two distinct genes constructs. *The Plant Journal*, 5: 285-297. 1994.

NUTT, K.A.; ALLSOPP, P.G.; MCGHIE, T.K.; SHEPHERD, K.M.; JOYCE, P.A.; TAYLOR, G.O.; MCQUALTER, R.B.; SMITH, G.R. Transgenic sugarcane with increased resistance to canegrubs. *Proceedings of the 1999 Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists*, Townsville, Queensland, Australia, 171-176. 1999.

NUTT, K.A. Characterization of proteinase inhibitors from canegrubs for possible application to genetically engineer pest-derived resistance into sugarcane. PhD: Queensland University of Technology, Brisbane, Australia. 2005.

OLIVA, M.L.V., SILVA, M.C.C., SALLAI, R.C., BRITO, M.V., SAMPAIO, M.U. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*, 11: 1667-1673. 2010.

OLIVEIRA, M.G.A.; DE SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 140: 369-380. 2005.

OLIVEIRA, A.S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R.O.; RIBEIRO, J.K.C.; MACEDO, L.L.P.; ANDRADE, L.B.S.; BEMQUERER, M.P.; SANTOS, E.A.; KIYOTA, S.; SALES, M.P. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7342-7349. 2007.

PAIR, S.D. Japanese honeysuckle (Caprifoliaceae): newly discovered host of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 23: 906-911. 1994.

PAIXÃO, G.P. Efeito de berenil, um inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, nas respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. 2010.

PARDE, V.D., SHARMA, H.C., KACHOLE, M.S. *In vivo* inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 56: 1315-1324. 2010.

PARRA, J.R.P. e MIHSFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management*, 195-209. 1992.

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba: FEALQ, 137p. 1996.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ed. Agronômica Ceres, 1: 193-217. 1995.

PICELLI, E.C.M. Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

PIUBELLI, G.C.; CAMPO, C.B.H.; MOSCARDI, F.; MMIYAKUBO, S.H.; OLIVEIRA, M.C.N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *Journal of Chemical Ecology*, 31: 1509-1525. 2005.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomol. Exp. Appl.*, 99: 79-85. 2001.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitors effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. *Entomol. Exp. Appl.*, 109: 217-224. 2003.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258: 598-599. 1975.

POWELL-ABEL, P., NELSON, R.S.; DE, B.; HOFFMANN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232: 738-743. 1986.

QUECINI, V.M. e VIEIRA, M.L.C. Plantas transgênicas. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 278-331. 2001.

- RAMOS, V.S.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P.; MACEDO, M.L.R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* (Benth.) seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Zeller). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 152: 255-261. 2009.
- RAYAPURAM, C. e BALDWIN, I.T. Using nutritional indices to study LOX3-dependent insect resistance. *Plant Cell Environ.*, 29: 1585-1594. 2006.
- RIBEIRO, C.W. Estabelecimento de uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene da canacistatina (CaneCPI-1), uma proteína inibidora de cisteíno-protease. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, 98p. 2007.
- ROMEIS, J; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, 24: 63-71, 2006.
- ROY, S. e DUTTA, S.K. Genomic and cDNA cloning, expression, purification, and characterization of chymotrypsin-trypsin inhibitor from *Winged Bean* seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73: 2671-2676. 2009.
- RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425-449. 1990.
- SAMBROOK, E.F.F. e MANIATIS, T. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2 edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- SAMBROOK, J. e RUSSELL, D.W.M. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3 edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, 16: 168-175. 1998.
- SILVA, F.R. Genotoxicidade ocasionada pelas folhas do fumo (*Nicotiana tabacum*) – expostas ou não a agrotóxicos – em *Cantareus aspersus*. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
- SILVA, W.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. *Process Biochem.*, 47: 257-263. 2011.
- SILVA-FILHO, M.C. e FALCO, M.C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidos pelas plantas. *Biociência & Desenvolvimento*, 12: 38-42. 2000.
- SONG, S.I.; KIM, C.H.; BAEK, S.J.; CHOI, Y.D. Nucleotide sequences of cDNAs encoding the precursors for soybean (*Glycine max*) trypsin inhibitors (Kunitz type). *Plant Physiol.*, 101: 1401-1402. 1993.
- STOTZ, H.U.; KROYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T. Plant insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 268-272. 1999.



STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185: 60-89. 1990.

TADESSE, Y.; SAGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimization of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75: 1-18. 2003.

TAMAKI, F.K. Serina proteinases digestivas de insetos-modelo. Tese apresentada ao Instituto de Química para obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica) da Universidade de São Paulo. 2011.

TEE, C.S. e MAZIAH, M. Optimization of biolistic bombardment parameters for *Dendrobium Sonia 17* calluses using GFP and GUS as the reporter system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 80: 77-89. 2005.

TELANG, M.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A.; HARSULKAR, A.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V.; SAINANI, M.; RANJEKAR, P.; GUPTA, G.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A.; GUPTA, V. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry*, 63: 643-652. 2003.

TELANG, M.A.; GIRI, A.P.; PYATI, P.S.; GUPTA, V.S.; TEGEDER, M.; FRANCESCHI, V.R. Winged bean chymotrypsin inhibitors retard growth of *Helicoverpa armigera*. *Gene*, 431: 80-85. 2009.

TELLAM, R.L. The peritrophic matrix, In: *Biology of Insect Midgut*, 1 st edition. Edited by LEHANE, M.J. e BILLINGSLEY, P.F. 86-114. 1996

TERRA, W.R. e FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109: 1-62. 1994.

TERRA, W.R e CRISTOFOLETTI, P.T. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 113: 725-730. 1996.

TERRA, W.R. The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 47-61. 2001

THOMAS, J.C.; ADAMS, D.G.; KEPPELNE, V.D.; WASMANN, C.C.; BROWN, J.K.; KANOST, M.R.; BOHNERT, H.J. *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Biochem.*, 33: 611-614. 1995.

TÖPFER, R., MATZEIT, V.; GRONENBORN, B.; SCHELL, J.; STEINBISS, H.H. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.*, 15, 5890. 1987.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br>. Acesso em: 06 jun. 2010.

WALDBAUER, G.P. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.*, 5: 229-288. 1968.

- WALLING, L.L. The myriad plant responses to herbivores. *Journal Plant Growth Regulation*, 19: 195-216. 2000.
- WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant defence - a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell, 258p. 2007.
- WEI, H.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1241-1251. 2003.
- WENG, L.; DENG, H.; XU, J.; LI, Q.; WANG, L.; JIANG, Z.; ZHANG, H.; LI, Q.; ZHANG, L. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. *Pest Management Science*, 62: 178-187. 2006.
- XU, L.P.; QUE, Y.X.; XU, J.S.; FANG, S.R.; ZHANG, M.Q.; CHEN, Y.Q.; CHEN, R.K. Establishment of genetic transformation system and obtaining transgenic sugarcane (var. badila) transformed with *rs* gene. *Sugar Technology*, 10: 128-132. 2008.
- YANG, L., FANG, Z., DICKE, M., VAN LOON, J.J.A., JONGSMA, M.A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 55-61. 2009.
- YEH, K.W.; LIN, M.I.; TUAN, S.J.; CHEN, Y.M.; LIN, C.Y.; KAO, S.S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep.*, 16: 696-699. 1997.
- ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; MONTAGU, M.V.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.*, 2: 2143-2150. 1983.
- ZHAO, Y.J.; SULKOWSKI, E.; PORATH, J. Surface topography of histidine residues in lysozymes. *Eur J Biochem.*, 202: 1115-1119. 1991.



## Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*

Vanessa da S. Ramos<sup>a</sup>, Odalys G. Cabrera<sup>b</sup>, Eduardo L.O. Camargo<sup>b</sup>, Alinne B. Ambrósio<sup>b</sup>, Ramon O. Vidal<sup>b</sup>, Desirée S. da Silva<sup>a</sup>, Lays C. Guimarães<sup>a</sup>, Sérgio Marangoni<sup>a</sup>, José R.P. Parra<sup>c</sup>, Gonçalo A.G. Pereira<sup>b</sup>, Maria L.R. Macedo<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica/Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes/Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 May 2012

Received in revised form 19 July 2012

Accepted 19 July 2012

Available online 2 August 2012

#### Keywords:

Proteinase trypsin inhibitor  
Biological control  
Cloning  
Plant–insect interaction

### ABSTRACT

Native *Inga laurina* (Fabaceae) trypsin inhibitor (ILTI) was tested for anti-insect activity against *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens* larvae. The addition of 0.1% ILTI to the diet of *D. saccharalis* did not alter larval survival but decreased larval weight by 51%. The *H. virescens* larvae that were fed a diet containing 0.5% ILTI showed an 84% decrease in weight. ILTI was not digested by the midgut proteinases of either species of larvae. The trypsin levels were reduced by 55.3% in the feces of *D. saccharalis* and increased by 24.1% in the feces of *H. virescens*. The trypsin activity in both species fed with ILTI was sensitive to the inhibitor, suggesting that no novel proteinase resistant to ILTI was induced. Additionally, ILTI exhibited inhibitory activity against the proteinases present in the larval midgut of different species of Lepidoptera. The organization of the *ilti* gene was elucidated by analyzing its corresponding genomic sequence. The recombinant ILTI protein (reILTI) was expressed and purified, and its efficacy was evaluated. Both native ILTI and reILTI exhibited a similar strong inhibitory effect on bovine trypsin activity. These results suggest that ILTI presents insecticidal properties against both insects and may thus be a useful tool in the genetic engineering of plants.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Agricultural production processes have been transformed many times in the past years due to food demand. The increase in the world population coupled with the decrease of the availability of agricultural land means that it is necessary to produce more food with less land. For major crops, losses due to insect pests are estimated at 10–20%, and these losses are one of the most significant factors limiting food production (Ferry et al., 2006).

Lepidoptera insects are one of the most important groups of crop pests in the world, and they often attack a wide range of crops, causing significant economic damage (Dunse et al., 2010). *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Crambidae), the sugarcane borer, is the major insect pest of sugarcane in Brazil and other South American countries. It is also responsible for significant economic damage to many other crops, including maize, sorghum and rice (Pompermyer et al., 2001, 2003). In addition, *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777)

(Lepidoptera, Noctuidae), the tobacco budworm, is present in both North and South America. This insect is highly polyphagous on its larval stage and is considered to be the major pest of tobacco, but it can also attack cotton, tomato, sunflower and soybean (Fitt, 1989; Brito et al., 2001).

Serine proteinases (trypsin, chymotrypsin and elastase-like endoproteinases) are the main enzymes present in the midgut of lepidopterans (Parde et al., 2010), including *D. saccharalis* and *H. virescens*. Proteinase inhibitors (PIs) are distributed in all living organisms, but they are more commonly described in plants (Major and Constabel, 2008; Lopes et al., 2009). PIs are usually found in different organs of the plants, such as seeds (Garcia et al., 2004; Gomes et al., 2005) and leaves (Bijina et al., 2011).

Proteinase inhibitors have shown deleterious effects against pest insects, and these effects have been described in both *in vitro* and *in vivo* assays (Bhattacharyya et al., 2007; Lingaraju and Gowda, 2008). The involvement of PIs in the defense strategy of plants against insects is based on the inhibition of the proteinases that are involved in vital processes in pests (Hilder et al., 1993; Jongasma and Bolter, 1997; Fan and Wu, 2005). When ingested by insects, PIs cause amino acid starvation and retard larval development (Giri et al., 2005; Oliva et al., 2010). Based on these results, the genes encoding

\* Corresponding author at: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Cidade Universitária S/N, CP: 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil. Tel.: +55 67 3345 7401; fax: +55 67 3345 7400. E-mail address: [bioplant@terra.com.br](mailto:bioplant@terra.com.br) (M.L.R. Macedo).

PIs have been used to produce transgenic plants resistant to insect attacks (Alfonso-Rubí et al., 2003; Abdeen et al., 2005; Dunse et al., 2010).

As a result of selective pressures, however, insect herbivores have developed multiple mechanisms of adaptation to overcome the defensive effects of PIs (Gatehouse, 2011). Among these mechanisms we can mention the overexpression of PI-sensitive enzymes (De Leo et al., 1998), the PIs proteolytic cleavage by insect proteases (Yang et al., 2009), and the expression of proteinases that are insensitive to inhibition (Jongsma et al., 1995; Brito et al., 2001). Because the adaptation is a result of the co-evolution between insects and plants, one possible way to obtain satisfactory results using PIs in pest control is to evaluate the potential of PIs purified from unrelated host plants to make the adaptation by pest insects more difficult (Jongsma and Bolter, 1997; Falco and Silva, 2003).

A previous study of our group described the purification of a trypsin inhibitor from *Inga laurina* seeds (Fabaceae, alt. Leguminosae) (ILTI), characterized by having a single polypeptide chain with 180 amino acid residues (Macedo et al., 2007). ILTI is a competitive type inhibitor and has been grouped into the Kunitz family of serine proteinase plant inhibitors based on homologous analyses. However, ILTI contains just one disulfide bridge differing from the majority of other Kunitz inhibitors (Macedo et al., 2007). In addition, ILTI showed a strong inhibitory activity against insect trypsin (Macedo et al., 2011).

This work presents the use of ILTI as a possible defense mechanism for sugarcane and tobacco crops against attacks of *D. saccharalis* and *H. virescens*, respectively. To evaluate the efficacy of ILTI as an insecticide tool against these important pest insects, bioassays incorporating ILTI into artificial diets were performed. Weight, survival and nutritional parameters were measured, and *in vitro* assays were used to determine the effects of ILTI on the development of these insects. We also tested the effect of this inhibitor *in vitro* on the tryptic activity of midgut proteinases from different lepidopteran pests: *Spodoptera frugiperda* (Smith), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) and *Tuta absoluta* (Meyrick). To explore the biotechnological potential of ILTI, we amplified and cloned the *ilti* open reading frame, the sequence of which had not been previously elucidated, and overexpressed the protein in *Escherichia coli*. The inhibitory activity of recombinant ILTI (reILTI) for bovine and insect trypsin was analyzed *in vitro*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The seeds of *I. laurina* (Willd.) (Fabaceae, alt. Leguminosae), a perennial tree native from the Southern America commonly known as ingá branco (Lorenzi, 2002), were collected in the city of Campo Grande, in the State of Mato Grosso do Sul (Brazil). Bovine serum albumin (BSA), bovine pancreatic trypsin, BAPNA (*N*-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide) and other electrophoresis reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Insects

*D. saccharalis* was laboratory-reared according to the methods of Parra and Mihsfeldt (1992). The larvae were contained in glass vials with their food and maintained at a temperature of 25 °C with a 12 h photophase. The diet for *D. saccharalis* was composed of soybean meal (*Glycine max*), sucrose, wheat germ, agar, a vitamin complex, ascorbic acid, Wesson salts, choline chloride, agar and microbial inhibitors (tetracycline, sorbic acid and nipagin).

A laboratory colony of tobacco budworm (*H. virescens*) was maintained under a 12 h photoperiod at 25 °C and 65% relative humidity. The larvae were reared on an artificial diet based on wheat germ (Parra, 1998). This diet was cooked during preparation, thus inactivating any inhibitors present in the wheat germ (Brito et al., 2001).

### 2.3. Isolation of *I. laurina* trypsin inhibitor (ILTI)

ILTI was prepared according to the methods of Macedo et al. (2011). The *I. laurina* seeds, which were free of integument and defatted using hexane, were ground in a coffee mill. A crude extract (CE) preparation was obtained by extraction of this meal with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6 (1:10, w/v), at 4 °C overnight, with subsequent centrifugation at 7,500 g for 30 min at 8 °C. The supernatant fraction was dialyzed against distilled water for 24 h at 4 °C and lyophilized. The lyophilized fraction (50 mg) was dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and applied to a DEAE-Sepharose column (2 × 20 cm) equilibrated in the same buffer at a flow rate of 30 mL/h. The fraction (5 mg) that was associated with inhibitory activity was submitted to ion-exchange chromatography on a HiTrap Q Sepharose column (5 mL), which was equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, at a flow rate of 30 mL/h. The proteins were detected by monitoring the absorbance at 280 nm.

### 2.4. Midgut preparation

The homogenates of the *D. saccharalis*, *H. virescens*, *S. frugiperda*, *A. ipsilon* and *T. absoluta* larval guts were prepared according to the methods of Macedo et al. (1993). The fourth-instar larvae were cold-immobilized and dissected in cold 150 mM NaCl. The midguts were surgically removed from the larvae using tweezers. The guts from larvae were subsequently homogenized in 150 mM NaCl and centrifuged at 10,000xg for 10 min at 4 °C, and the supernatants were collected and used as a source of enzymes for enzymatic assays. The samples were stored at –20 °C to prevent alteration of the proteolytic activity. The protein concentration of the extracts was determined according to the Bradford method (1976), with bovine serum albumin (BSA) as the standard.

### 2.5. Fecal pellet preparation

Feces from the fourth-instar larvae of *D. saccharalis* and *H. virescens* were collected during the experiment and frozen (–20 °C). For the *in vitro* enzymatic assays, these feces were macerated, homogenized in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 and centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C, and the supernatants were used.

### 2.6. Enzyme assays

The trypsin-like enzymes (EC 3.4.24.4) of the whole midgut extracts and fecal samples from *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae that were fed with a diet containing ILTI or a control diet were assayed using a synthetic substrate, BAPNA, as described by Erlanger et al. (1961). For routine assays, 200 µL of 1 mM BAPNA was used in a final volume of 270 µL. Solutions of 50 mM Tris-HCl buffer and the enzyme were pre-incubated at 37 °C for 10 min before adding substrate to start the reaction. The total assay time was 30 min. Changes in the absorbance at 410 nm were recorded using a VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). Each assay was performed in triplicate.

### 2.7. Effects of ILTI on the development of *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae

To evaluate the effects of ILTI on insect development, neonate larvae were placed individually in glass pipes (8.5 × 2.5 cm) covered with cotton, and ILTI was added to the artificial diet at a concentration of 0.1% for *D. saccharalis* and 0.5% for *H. virescens*. A control diet without the inhibitor was also prepared. Each treatment included ten replicates with four larvae (n = 40). The larvae were maintained at a relative humidity of 65–70% and a temperature of 25 °C. At the end of the fourth instar, the weight, number of larvae, larval consumption and fecal output were analyzed for the assessment of

nutritional parameters. The tryptic activities of the midgut and fecal samples were also determined.

### 2.8. Nutritional parameters

A number of nutritional parameters were compared among fourth-instar larvae exposed to either an ILTI-supplemented diet or the control diet. The larvae, feces and uneaten food were separated using a stereo microscope, dried in an incubator at 50 °C and weighed. The nutritional indices of consumption, digestion and utilization of food were calculated as described by Waldbauer (1968) and Farrar et al. (1989). The nutritional indices, namely the efficiency of conversion of ingested food (ECI), the efficiency of conversion of digested food (ECD) and the approximate digestibility (AD) were calculated as follows: ECI  $(\Delta B/I) \times 100$ ; ECD  $[\Delta B/(I - F)] \times 100$ ; and AD  $[(I - F)/I] \times 100$ , where I = weight of food consumed,  $\Delta B$  = change in body weight, and F = weight of feces produced during the feeding period. The metabolic cost (MC) was calculated as  $100 - ECD$ .

### 2.9. ILTI inhibitory activity on larval proteinases

The effects of ILTI on the enzymatic activity of the midgut extracts from (1) *D. saccharalis* and *H. virescens* fed with a control diet or a diet containing inhibitor and (2) *S. frugiperda*, *A. ipsilon* and *T. absoluta* fed with an artificial diet were determined using BAPNA as a substrate. The samples of the midgut extracts were incubated for 10 min at 37 °C with increasing concentrations of ILTI in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0. The enzymatic assay conditions were similar to those of the enzymatic assay described on Section 2.6.

### 2.10. Digestion of ILTI

The midguts of fourth-instar *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae were dissected, extracted in 1 mL of 0.1 M Tris, pH 8.0, and processed as described on Section 2.4. ILTI was incubated with this homogenate in Tris buffer (final concentration, 2 mg/mL). The ILTI/midgut protein ratio was 1:10 (w/w). The digestion was performed for 0, 1, 6, 24 and 48 h at 37 °C and was stopped by immersing the tubes in boiling water for 2 min. The degradation of BSA was used as a positive control for serine proteinase activity. The proteins were subsequently separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 12.5% polyacrylamide gels.

### 2.11. Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE 12.5% was performed as described by Laemmli (1970). The proteins used as molecular mass standards were phosphorylase (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14 kDa). The proteins were detected by staining with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250.

### 2.12. Isolation and sequencing of the *ilti* gene

*I. laurina* young leaves were collected and ground into a fine powder in liquid N<sub>2</sub>. The genomic DNA was extracted according to the CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) method described by Zhang et al. (1996). The DNA was used as the PCR template to amplify the *ilti* gene. Two degenerate primers, forward (5'-GAGGT(T/C/G)GT(T/C/G)GT(T/C/G)GACTC(A/T)GACGGC-3') and reverse (5'-ATT(A/G)TCCTT(A/C/G/T)ACCTT(A/G)TCGAACCTG-3'), were designed on the basis of the ILTI amino acid sequences published by Macedo et al. (2007). PCR was performed with a denaturation cycle at 94 °C for 3 min followed by 30 amplification cycles consisting of denaturation at 94 °C for 50 s, annealing at 56 °C for 50 s, and extension at 72 °C for 1 min. The amplification product was cloned into the pGEM-T Easy

vector (Promega Corp., Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Probable recombinant clones, selected using ampicillin (50 µg/mL) and X-Gal (30 mg/mL), were submitted to plasmid DNA isolation and screened for the presence of the gene. This screening was performed by PCR using degenerate primers, and by sequencing in both directions with the universal M13 primers and the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), to ensure the proper reading frame. The samples were loaded onto a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequence analyses were performed using BLAST tools available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

### 2.13. Overexpression of the SUMO-reILTI fusion protein in *E. coli*

The *ilti* gene was amplified by PCR using the forward primer 5'-GGATCCGAGGTGGTGGTGACTCAG-3' and the reverse primer 5'-GTCCACCTAATTGCTCTTGACCTGTGCG-3', which included the entire ILTI coding sequence in-frame with the BamHI/SalI sites of the pETSUMO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The pETSUMO(+) vector used was a modified version, containing a histidine tag at its N-terminus. The resulting construction pETSUMO-reILTI was used to transform Rosetta II *E. coli* strain (Novagen, Madison, WI, USA). The cells were grown at 37 °C in 50 mL of LB medium containing 100 µg/mL kanamycin and 100 µg/mL chloramphenicol. When the OD<sub>600</sub> reached 0.6, IPTG was added to a final concentration of 1 mM to induce the expression of the fusion protein. After 4 h at 37 °C, the bacterial cells were harvested by centrifugation at 2,056xg for 20 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 10 mL of lysis buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.0, containing 0.1% (w/v) lysozyme, 2% (w/v) streptomycin and 150 mM NaCl) and sonicated four times in 20 s bursts at medium intensity. The resulting lysate was separated into soluble and insoluble fractions by centrifugation (18,000 g) for 30 min at 4 °C. A 15 µg aliquot of crude protein extract was analyzed using 12.5% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

### 2.14. Purification of the SUMO-reILTI fusion protein and preparation of reILTI

The SUMO-reILTI fusion protein was purified from the soluble fraction using a purification HiTrap™ Chelating HP column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) loaded with 5 mL of 0.5 M NiSO<sub>4</sub> and equilibrated with 10 mM Tris–HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl and 5 mM imidazole. In brief, the crude protein extracts were loaded onto a column, and after washing, the SUMO-reILTI fusion protein was eluted using 200 mM imidazole. The fusion protein was then incubated overnight at room temperature with an appropriate amount of the proteinase ULP-1 for His-SUMO tag removal. The cleaved protein was purified with affinity chromatography trypsin-Sepharose equilibrated with 100 mM phosphate buffer, pH 7.6, containing 100 mM NaCl. The absorbed ILTI was eluted with 100 mM HCl. The collected fractions were analyzed using 12.5% SDS-PAGE, and the protein concentration was determined using the Bradford assay (Bradford, 1976) with bovine serum albumin (BSA) as the standard.

### 2.15. Assay for the bovine trypsin inhibitory activity of reILTI

The bovine trypsin inhibitory activities of the SUMO-reILTI fusion protein, reILTI and native ILTI were measured by incubating various amounts of ILTI with fixed amounts of bovine trypsin (0.25 mg/mL) in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, for 10 min at 37 °C. The residual trypsin activity was determined by adding 200 µL of 1 mM BAPNA (final assay volume of 270 µL) at 37 °C. The total assay time was 30 min. The changes in the absorbance at 410 nm were recorded using a VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

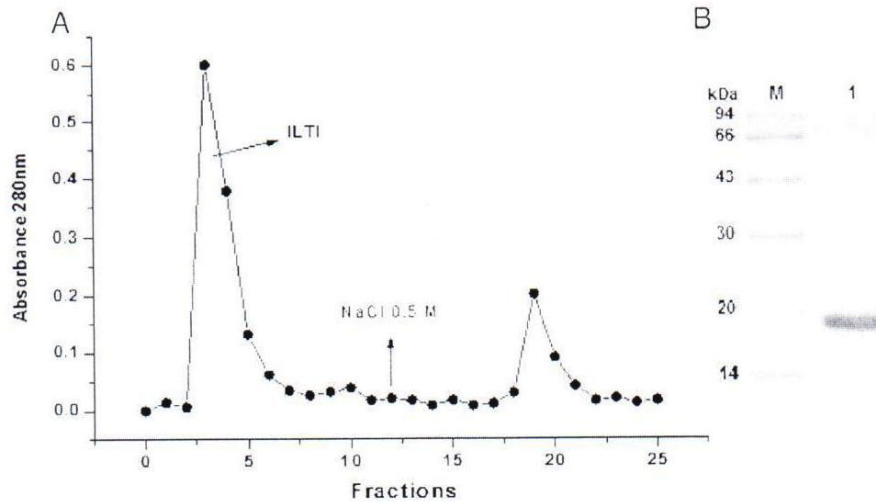


Fig. 1. Purification of ILTI. (A) Ion-exchange chromatography equilibrated in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. (B) SDS-PAGE electrophoresis: Lane M, molecular-mass marker. Lane 1, ILTI.

### 2.16. Inhibitory activity of reILTI on the digestive enzymes of *D. saccharalis* and *H. virescens*

The *in vitro* effect of reILTI toward the trypsin-like proteinases extracted from *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae was measured using BAPNA as substrate. The samples of gut extracts were incubated with different concentrations of reILTI in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0. After a 10 min incubation at 37 °C, 200  $\mu$ L of 1 mM BAPNA were added (final assay volume of 270  $\mu$ L). The total assay time was 30 min. The changes in the absorbance at 410 nm were recorded using a VersaMax Microplate Reader.

## 3. Results

### 3.1. Purification of ILTI

ILTI was isolated from *I. laurina* seed extracts using size exclusion and ion exchange chromatography. Two peaks with absorbance at 280 nm were collected (Fig. 1A). However, only the first peak showed trypsin activity (data not shown). The SDS-PAGE analysis demonstrated a single polypeptide of approximately 20 kDa (Fig. 1B).

### 3.2. The antimetabolic effects of ILTI on the development of *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae

The effect of ILTI on the development of both insect species was monitored by incorporating ILTI into an artificial diet at levels of 0.1% for *D. saccharalis* and 0.5% for *H. virescens* and then determining the number and weight of surviving fourth-instar larvae. Among the ILTI concentrations tested, the values of 0.1% and 0.5% of inhibitor for *D. saccharalis* and *H. virescens*, respectively, were chosen because the effects of ILTI at these concentrations on larval survival were considered appropriate for *in vivo* experiments. The antimetabolic effect of ILTI on the growth of *D. saccharalis* larvae is shown in Fig. 2A and B. Survival of the ILTI-fed larvae was not affected (Fig. 2A), but the average mass of the ILTI-fed larvae decreased by approximately 51% (Fig. 2B). The inset in Fig. 2B shows the variation in the size of the control-fed and ILTI-fed *D. saccharalis* larvae. Similar results were observed for *H. virescens*; specifically, no difference in the larval survival was noticed (Fig. 3A), whereas a pronounced reduction in the average mass (84%) was observed (Fig. 3B). The inset in Fig. 3B shows the variation in the size of the control-fed and ILTI-fed *H. virescens* larvae.

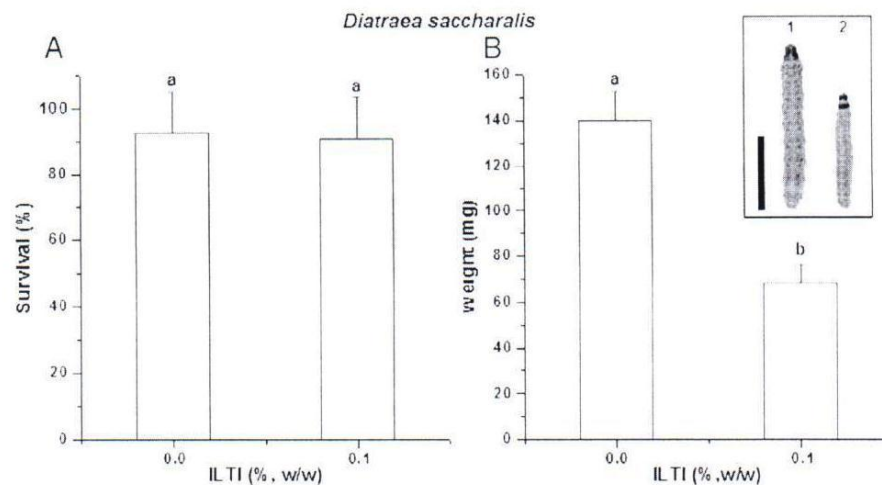


Fig. 2. Effect of dietary ILTI on *D. saccharalis* development when administered in an artificial diet for 20 days. (A) Larval survival. (B) Larval weight. Inset: variation in the size of fourth-instar larvae fed the control diet (1) or a diet containing 0.1% ILTI (2). Identical letters indicate that there were no significant differences ( $p < 0.05$ ; Student's *t*-test). Bar = 1 cm.

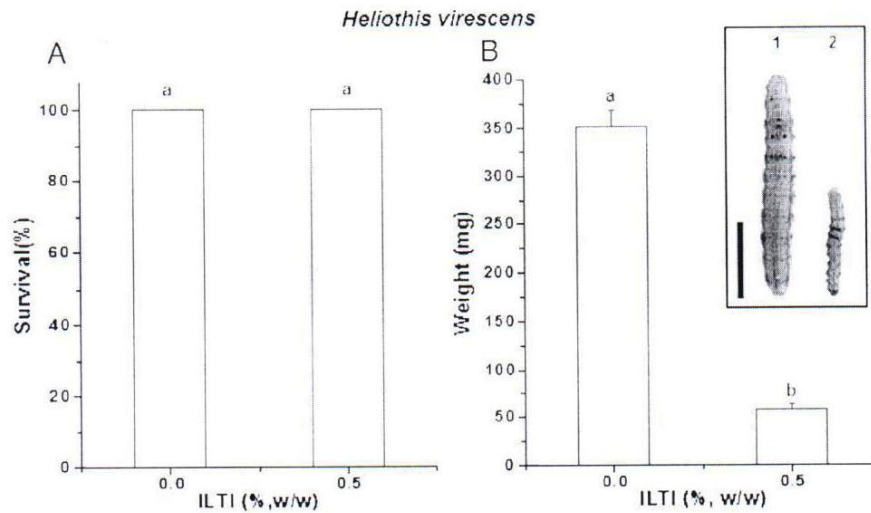


Fig. 3. Effect of dietary ILTI on *H. virescens* development when administered in an artificial diet for 10 days. (A) Larval survival. (B) Larval weight. Inset: variation in the size of the fourth-instar larvae fed the control diet (1) or a diet containing 0.5% ILTI (2). Identical letters indicate that there were no significant differences ( $p < 0.05$ ; Student's *t*-test). Bar = 1 cm.

### 3.3. Digestion of ILTI

The susceptibility of ILTI to degradation by the midgut enzymes of *D. saccharalis* and *H. virescens* was assessed by incubating the inhibitor with the midgut extracts, and this was followed by SDS-PAGE analysis. The profiles of the protein bands are presented in Fig. 4A and B, respectively. Through the analysis of the gel, it was observed a band of approximately 20 kDa, which represents the undigested inhibitor; thus, we concluded that ILTI is resistant to degradation by the midgut proteinases of both insects, even after long periods of up to 48 h of incubation. In our positive control, BSA was hydrolyzed from the first hour onwards when incubated with the extracts (data not shown).

### 3.4. Nutritional data

As shown in Fig. 5, no difference in the diet intake for *D. saccharalis* was noticed; however, a decrease of 48% in the fecal output of ILTI-fed larvae was observed compared with that of the control-fed larvae. For the ILTI-fed *H. virescens* larvae, the diet intake and fecal output decreased by 53.6% and 94.8%, respectively, relative to the control group (Fig. 6). These data were used to determine the nutritional indices for both insects. The nutritional analyses suggest that ILTI exerts

entomotoxic effects on *D. saccharalis* (Table 1) and *H. virescens* larvae (Table 2). For the *D. saccharalis* larvae, the ECD, which is the amount of food effectively absorbed from the gut, decreased by 49.3%, the metabolic cost (MC) increased by 7.6%, and there were no significant alterations observed in the ECI and AD. All of the nutritional parameters were altered for *H. virescens*. The ECI, which is the gain of biomass relative to the amount of food ingested, and the ECD decreased by 68% and 80%, respectively, whereas the AD, which is the efficiency of assimilation of the ingested food, and the MC increased by 61% and 29%, respectively, compared with the controls.

### 3.5. Enzyme assays and inhibition of larval proteinase activity after ingestion of ILTI

Figs. 7 and 8 show the trypsin-like activity of the gut and fecal extracts of the control and ILTI-treated larvae. The consumption of an artificial diet containing ILTI did not alter the trypsin-like activity in the *D. saccharalis* gut (Fig. 7A), but it significantly decreased (by 55%) the fecal proteinase activity (Fig. 7B). No difference was observed in the tryptic activity in the midgut from the ILTI-fed *H. virescens* larvae (Fig. 8A), and the total fecal tryptic activity increased by ~24% after the ingestion of ILTI (Fig. 8B).

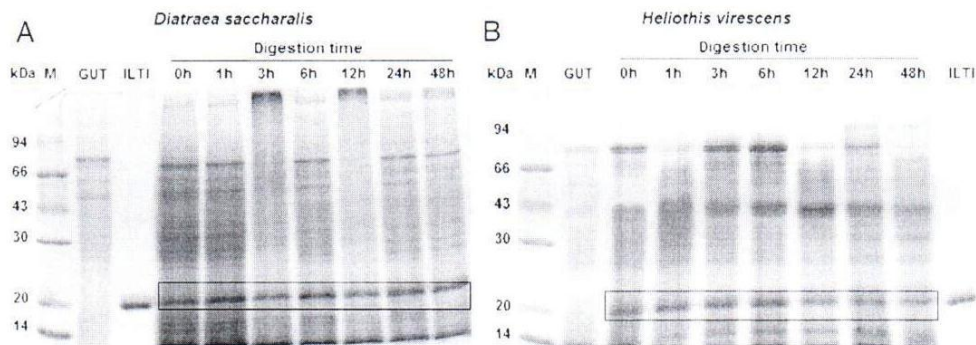


Fig. 4. Electrophoretic SDS-PAGE analysis of the *in vitro* digestibility of ILTI by enzymes from the midgut (GUT) of *D. saccharalis* (A) and *H. virescens* (B). ILTI was subjected to digestion by proteolytic enzyme preparations from *D. saccharalis* and *H. virescens* for up to 48 h at 37 °C. Lane M, molecular-mass marker. The ILTI band is indicated by a box.

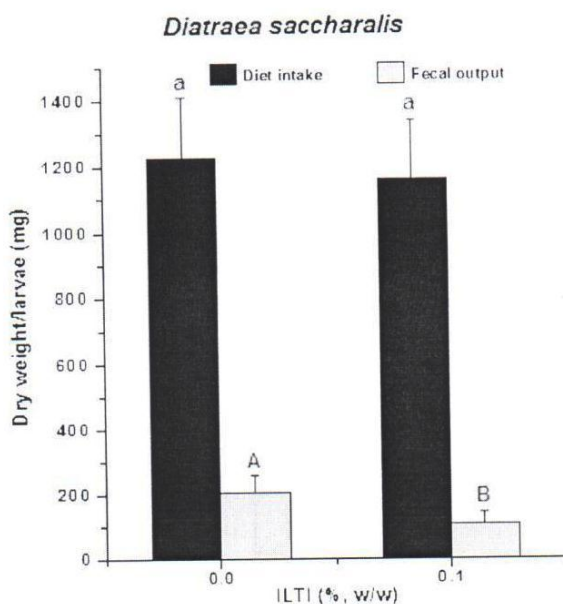


Fig. 5. Physiological parameters measured for *D. saccharalis* larvae. The larvae were fed on control diets or diets containing 0.1% ILTI. Diet intake by the larvae (mg; dry weight basis) and the fecal output of the larvae (mg; dry weight basis) were measured. Different letters denote a significant difference between the treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

To evaluate the sensitivity of trypsin from the control-fed and ILTI-fed larvae, *in vitro* assays were performed with increasing concentrations of ILTI, and the residual enzymatic activity was then measured. The profile of trypsin inhibition was quite similar in both groups, and the similarity between the patterns suggests that the trypsins from the ILTI-fed larvae remained sensitive to inhibition by ILTI. This result also corroborates the hypothesis that no new insensitive protease was produced (Fig. 9A and B), as reported for other pest insects when challenged with dietary PIs (Bown et al., 2004; Brioschi et al., 2007).

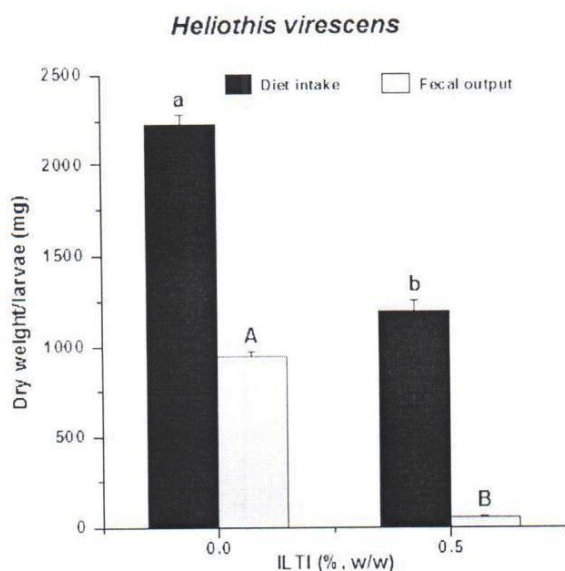


Fig. 6. Physiological parameters measured for *H. virescens* larvae. The larvae were fed on control diets or diets containing 0.5% ILTI. Diet intake by the larvae (mg; dry weight basis) and the fecal output of the larvae (mg; dry weight basis) were measured. Different letters denote a significant difference between the treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Table 1

Nutritional indices of *D. saccharalis* fourth-instar larvae on 0.1% ILTI-treated and control diet.

Nutritional indices (mean ± SE)				
Treatment (%)	ECl (%)	ECD (%)	AD (%)	CM (%)
0.0	10.6 ± 2.5a	13.6 ± 3.4a	86.1 ± 5.2a	86.4 ± 3.4a
0.1	6.3 ± 1.5a	6.9 ± 1.5b	91.0 ± 2.9a	93.0 ± 1.5b

Means within a column followed by the same letter are not significantly different,  $p < 0.05$ ; based on Tukey's test.

Table 2

Nutritional indices of *H. virescens* fourth-instar larvae on 0.5% ILTI-treated and control diet.

Nutritional indices (mean ± SE)				
Treatment (%)	ECl (%)	ECD (%)	AD (%)	CM (%)
0.0	15.9 ± 2.1a	26.7 ± 2.6a	59.9 ± 7.4a	73.3 ± 2.6a
0.5	5.0 ± 3.7b	5.3 ± 4.1b	96.2 ± 3.3b	94.7 ± 4.1b

Means within a column followed by the same letter are not significantly different,  $p < 0.05$ ; based on Tukey's test.

### 3.6. Effects of ILTI on endogenous proteolytic activity

Fig. 10 shows the specificity of ILTI against the trypsin-like activity from the larval midguts of three different species of Lepidoptera. The susceptibility of the larval trypsin-like enzyme to inhibition by ILTI varied among the three species of Lepidoptera. ILTI (0.08 µg) decreased the tryptic activity by 95%, 71.8% and 20% in the midguts of *S. frugiperda*, *A. ipsilon* and *T. absoluta*, respectively.

### 3.7. The *ilti* gene structure

Degenerate primers were designed based on the amino acid sequence of the ILTI native protein, which was published by Macedo et al. (2007). Therefore, the gene was amplified without its signal peptide region.

A fragment of approximately 540 bp corresponding to the *ilti* gene was amplified by PCR with genomic DNA as a template (Fig. 11A). The amplified DNA fragment was cloned into a pGEM-T Easy vector, and the recombinant clones were analyzed by PCR with the degenerate primers. One clone was selected based on the expected size of the DNA fragment (534 bp). The sequencing results showed that the fragment included the entire *ilti* gene without any introns (Fig. 11B).

The amino acid sequence deduced from the DNA clone confirmed the reported amino acid sequence of native ILTI, except two amino acid residues, Lys and Tyr, between residues Val 95 and Lys 98 of the amino acid sequence were absent (Macedo et al., 2007). The sequence analyses of the *ilti* gene confirmed the similarity of this gene to those of other Kunitz-type inhibitors (data not shown). The complete nucleotide sequence of the *ilti* gene was submitted to the genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank accession no.: JF766936).

### 3.8. Construction of expression plasmids and overexpression of the SUMO-reILTI fusion protein in *E. coli*

The DNA fragment cloned in the pGEM-T Easy vector that encodes the 178 amino acids of ILTI was isolated using BamHI and Sall endonucleases. The fragments were ligated into pETSUMO using T4 DNA ligase. The desired expression vector with the insert was confirmed by nucleotide sequencing. The SUMO-reILTI fusion protein was obtained by expressing pETSUMO-reILTI in *E. coli* Rosetta II cells. The fusion protein was purified from the *E. coli* lysate using a HiTrap Chelating column, as shown in Fig. 12. The purified fusion protein



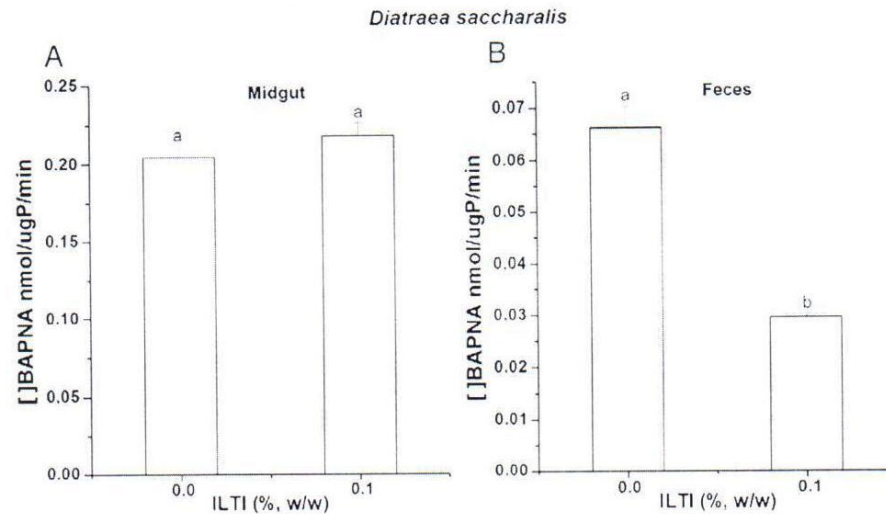


Fig. 7. Trypsin-like activities in fourth-instar *D. saccharalis* larvae fed on a control artificial diet or a diet containing 0.1% ILTI. (A) Enzymatic activities of the midgut. (B) Enzymatic activities of the feces. The trypsin activity was evaluated using BAPNA as substrate.

was then treated with proteinase ULP-1 and purified using trypsin-Sepharose affinity chromatography to obtain reILTI.

### 3.9. Trypsin inhibitory activity of reILTI

The bovine trypsin inhibitory activity of the fusion protein and of reILTI was tested and compared with that of the native ILTI (Fig. 13A). On a molar basis, reILTI, the fusion protein and the native ILTI protein exhibited identical inhibitory properties against trypsin. Fig. 13B shows the effect of reILTI toward the trypsin proteinases extracted from *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae. The reILTI (5.1  $\mu$ g) decreased the trypsin activity by 34.5% and 90.7% in the guts of *D. saccharalis* and *H. virescens*, respectively.

## 4. Discussion

Plants have developed both physical and molecular strategies to limit consumption by insect pests while attracting insect pollinators

(Dunse et al., 2010). One of the most common inducible herbivore defenses in plants is the rapid synthesis of PIs (Ryan, 1990). PIs play essential roles in biological systems, including regulating proteolytic processes and participating in defense mechanisms against attack by organisms such as insects (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002), fungi (Kim et al., 2005) and other pathogenic microorganisms (Breiteneder and Radauer, 2004). PI expression is frequently not lethal to the herbivores, but it slows their growth and thereby extends the time during which those herbivores might be susceptible to predators (Hartl et al., 2010). Because PIs are primary gene products, they are excellent candidates for engineering pest resistance into plants (Marchetti et al., 2000).

In this study, the insecticidal activity of ILTI was tested by incorporating the protein into an artificial diet fed to the sugarcane borer *D. saccharalis* and the tobacco budworm *H. virescens*. When incorporated into the artificial diet at a concentration of 0.1% for *D. saccharalis*, ILTI did not affect larval survival and decreased weight gain by 51% (Fig. 2A and B). ILTI administered at a concentration of

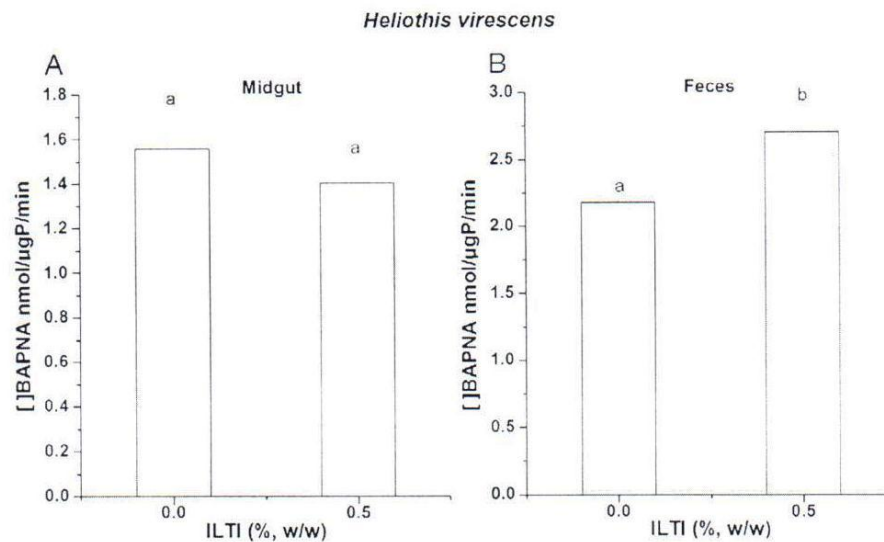


Fig. 8. Trypsin-like activities in fourth-instar *H. virescens* larvae fed on a control artificial diet or a diet containing 0.5% ILTI. (A) Enzymatic activities of the midgut. (B) Enzymatic activities of the feces. The trypsin activity was evaluated using BAPNA as substrate.

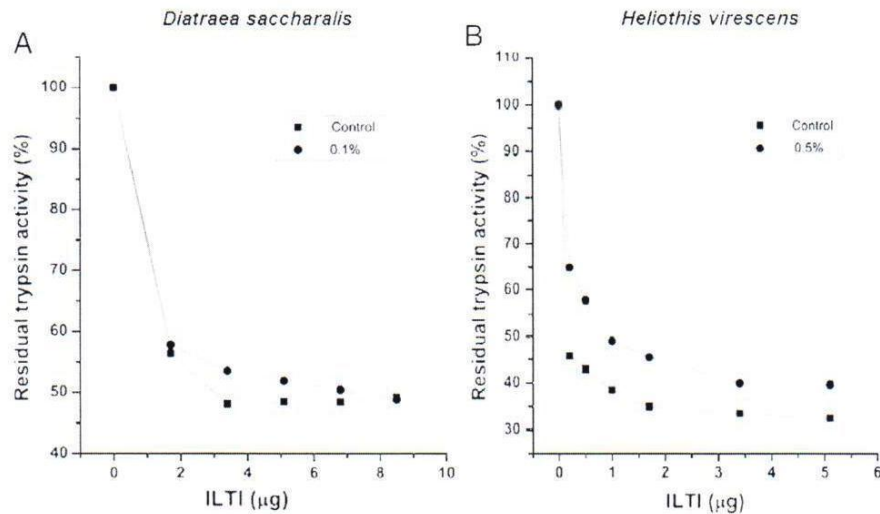


Fig. 9. Inhibition by ILTI of the midgut proteolytic activity (assayed with BAPNA) of the fourth-instar larvae of *D. saccharalis* (A) and *H. virescens* (B) reared on artificial diets. The experiments were performed in triplicate. The standard error bars (coefficients of variation < 20%) have been omitted for clarity.

0.5% in the artificial diet of *H. virescens* reduced the larval weight by 84%, but it did not alter larval survival (Fig. 3A and B). The results presented here show that ILTI exerts antinutritional activity against *D. saccharalis* and *H. virescens*. Similar results have been reported for other inhibitors. An inhibitor from *Adenanthera pavonina* seeds added to an artificial diet at a concentration of 0.1% reduced the larval mass of *D. saccharalis* by 67% (Silva et al., 2011). Chymotrypsin inhibitors isolated from winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus*) caused a significant reduction in the growth of *Helicoverpa armigera* larvae after the larvae were fed with artificial diets that included the inhibitors (Telang et al., 2009). The concentration of ILTI used in these bioassays corresponded to the levels in legume seeds and

was similar to those used in others studies (Babu and Subrahmanyam, 2010).

The susceptibility and stability of ILTI to the action of the proteolytic enzymes from the midgut homogenates of *D. saccharalis* and *H. virescens* were examined. ILTI was resistant to proteolysis when incubated with the midgut proteinases from *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae up to the fourth instar (Fig. 4A and B). Insects also secrete proteinases that may be able to digest the inhibitor protein (Michaud, 1997; Girard et al., 1998a,b; Giri et al., 1998). The results with ILTI are promising, once that proteins that are resistant to digestion by midgut proteinases are more effective and may be useful for controlling insect populations (Harsulkar et al., 1999; Telang et al., 2003). A similar result was also found for DrTI (the trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds) when its digestibility was tested against trypsin-like enzymes from the midgut of *Anagasta kuehniella* and *Corcyra cephalonica* larvae (Macedo et al., 2009).

Additionally, trypsin activity was found in the gut and fecal extracts. The ILTI-fed *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae had reduced growth rates; however, the trypsin activity of the midgut was similar to that of the control larvae in both species (Fig. 7A and B). Broadway and Duffey (1986) observed a similar effect on the growth of *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua* after these species were fed a diet supplemented with two trypsin inhibitors, whereas the tryptic activity of the midgut was not reduced. Our results also suggest that the reduction in the insect growth rate could be related to an overexpression of trypsin enzymes in order to compensate the inhibitory effect of ILTI. As a consequence, there is a decline in the availability of the amino acids essential for synthesizing of other proteins necessary for the insects' development.

With regard to the tryptic activity in the feces, the groups of these two species that were reared on the artificial diet containing ILTI exhibited a different profile compared with the respective control groups. The tryptic activity of *D. saccharalis* was lower than that of the control group (Fig. 7B), whereas the activity of *H. virescens* was higher (Fig. 8B). It is possible that the differences in response patterns occur due to the existence of distinct action mechanisms in both insects. Macedo et al. (2002) reported that DMTI-II, a trypsin inhibitor isolated from *Dimorphandra mollis* seeds, interacted with chitin, a constituent of larval midgut membranes. The result of this interaction might be a perturbation of the peritrophic membrane, resulting in an overflow of midgut enzymes. A plausible explanation for our results could be that both insect have differences in the constitution of

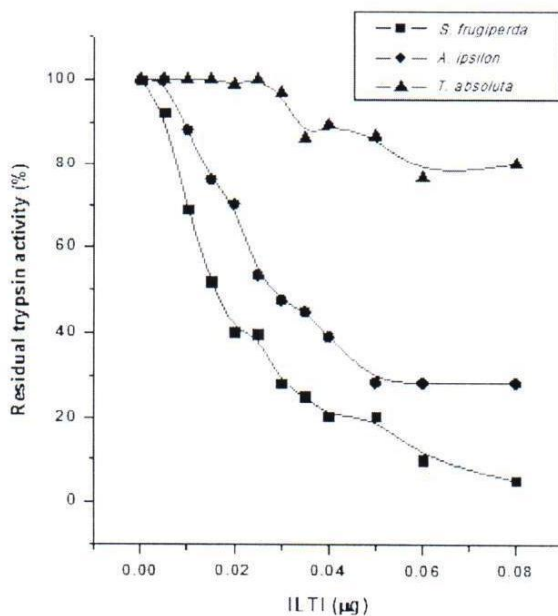
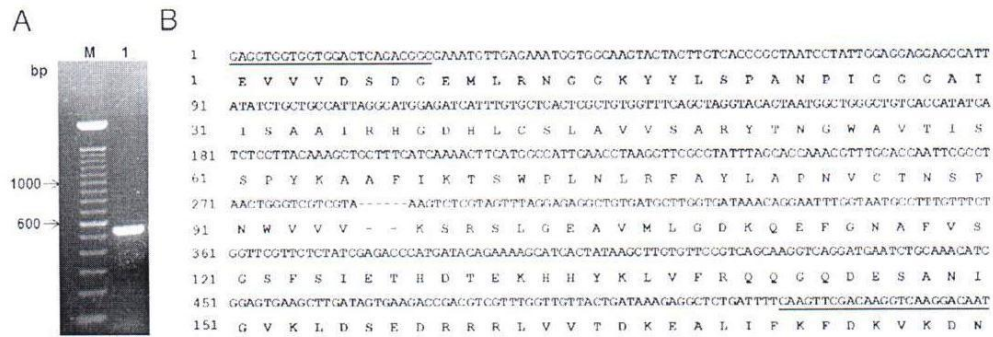


Fig. 10. Inhibition by ILTI of the midgut proteolytic activity (assayed with BAPNA) of the fourth-instar larvae of three different lepidopteran pests. The standard error bars (coefficients of variation < 20%) have been omitted for clarity.



**Fig. 11.** Isolation and sequencing of the *ilti* gene. (A) Amplification of the genomic DNA of *I. laurina*, using ILTI degenerate primer pairs. Lane M, 100 bp ladder marker. Lane 1, PCR products obtained using genomic DNA as a template. (B) Nucleotide sequence of ILTI in the coding region and its deduced amino acid sequence. The locations of the oligonucleotide primers used in the primer extension analyses are underlined. (–) indicates the absence of two amino acid residues compared by amino acid sequence analysis.

their midgut membranes promoting a weak interaction of ILTI with membrane structures in *H. virescens* larvae, increasing the trypsin activity in its feces; while ILTI would not interact with *D. saccharalis* membrane structures.

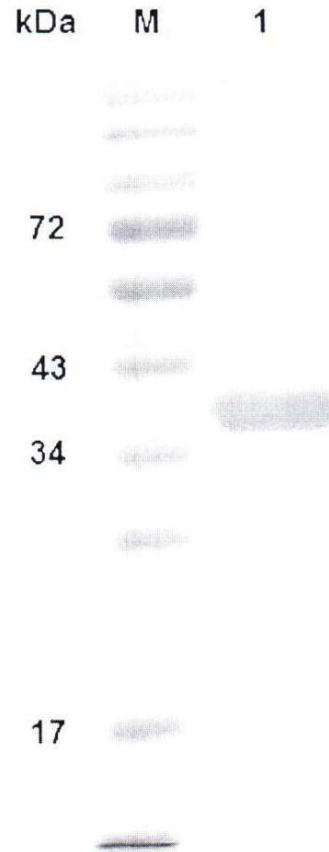
Dietary utilization experiments showed that ILTI, when incorporated into an artificial diet, did not alter the intake of the diet, but it did decrease the fecal output of *D. saccharalis* larvae (Fig. 5); conversely, in *H. virescens* larvae fed ILTI, there was a decrease in both intake diet and fecal output (Fig. 6). Treatment with ILTI altered the physiology and metabolism of the insects (Tables 1 and 2), and both the ECD and the MC of the insects were negatively affected. The ECD decreases as the proportion of digested food metabolized for energy increases (Coelho et al., 2007). The decrease in the ECD value suggests that ingested ILTI also exhibits some toxicity. This result is in agreement with the increase in the metabolic cost of these larvae. For *H. virescens*, we also noted effects on the ECI and AD. The ECI is an overall measure of an insect's ability to utilize ingested food for growth. A decreased in the ECI suggests that more food is being metabolized for energy and less is being converted to bodily substances, most likely to circumvent the antinutritional effect of this protein. The increase in the AD observed for ILTI-fed larvae was most likely a result of the lower output of feces by these larvae relative to the control group. This fact was also observed by Mordue (Luntz) and Blackwell (1993) and Rayapuram and Baldwin (2006).

The trypsin proteinase activity in ILTI-fed larvae was sensitive to ILTI (Fig. 9A and B), indicating that no novel proteolytic form resistant to ILTI was induced in the larvae reared on a diet containing this inhibitor. *D. saccharalis* and *H. virescens* did not adapt to ILTI, at least up to the fourth instar of the first generation. These experiments suggest that ILTI is a promising candidate for controlling these two pests.

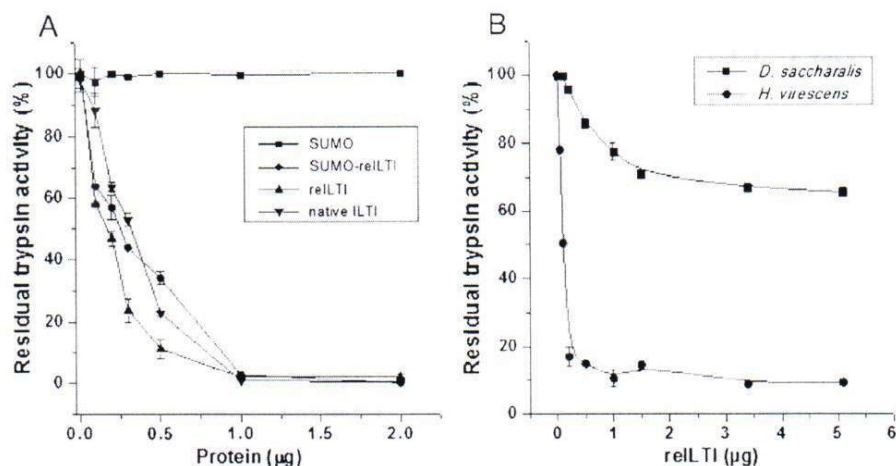
To assess the potential for the global use of this inhibitor, the effectiveness of this inhibitor against other pests was tested. ILTI was assayed *in vitro* against proteinases from three species of insect pests, *S. frugiperda* (a pest of corn), *A. ipsilon* (a pest of many important grains) and *T. absoluta* (a pest of tomato), all of which belong to the order Lepidoptera (Fig. 10). The inhibitory activity of ILTI was efficient against the trypsin-like enzymes extracted from the larvae of these insect species, suggesting that ILTI could affect larval development when incorporated into the diet of the larvae.

During the past decade, the use of transgenic crops has been rapidly increasing, particularly with the discovery of effective plant genes that can be transferred among crop plants and offer resistance against pests and pathogens (Oliveira et al., 2007). PI genes from various sources have been transferred to several plants of economic interest, resulting in transgenic plants that are more resistant to insect invasion (Boulter, 1993). The *ilti* gene was isolated from the genomic DNA of *I. laurina* and cloned in a heterologous system to

evaluate the potential for ILTI as a candidate for production of plants that are more resistant to Lepidoptera pests. This paper provides the first report of the *ilti* sequence, thus enabling further molecular and functional studies of the encoded protein. The strategy of using degenerate primers in combination with PCR proved to be effective for overcoming the difficulties in cloning a novel gene when the cDNA or genomic library is not available. The deduced amino acid



**Fig. 12.** SDS-PAGE analysis (12.5%) of the purification of the SUMO-reILTI fusion protein from the soluble fraction using a purification column. Lane M, molecular-mass marker. Lane 1, SUMO-reILTI fusion protein.



**Fig. 13.** Inhibitory activity of reILTI. (A) Trypsin inhibitor activity of SUMO-reILTI fusion protein, reILTI and native ILTI. Increasing amounts of inhibitor were mixed with a fixed amount of bovine trypsin. Each point is the mean of three assays. (B) Inhibition by reILTI of the midgut proteolytic activity of *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae. The residual enzyme activity was determined using BAPNA as substrate.

sequence of ILTI determined using the DNA sequence of the genomic clone had the same nucleotide sequence as that in the coding region, indicating that the genomic DNA does not have any intervening sequences and that *ilti* is an intronless gene (Fig. 11A and B). This finding is similar to the results from other Kunitz inhibitors that are devoid of introns. The genomic clone isolated from soybeans encoding a Kunitz-type trypsin inhibitor was also reported to be an intronless gene (Song et al., 1993). Another Kunitz-type chymotrypsin–trypsin inhibitor gene isolated from winged beans (WbCTI) was also found to be intronless (Roy and Dutta, 2009). The amino acid sequence deduced from the DNA clone agrees with the reported amino acid sequence of native ILTI from *I. laurina* seeds except for the absence of two amino acid residues, Lys and Tyr, which were located between residues Val 95 and Lys 98 of the native amino acid sequence. These differences between the native protein sequence and the amino acid sequence deduced from the genomic DNA suggest that *I. laurina* may contain several related trypsin inhibitor genes, such as those described for soybean (*Glycine max*) trypsin inhibitors (Song et al., 1993; Gotor et al., 1995) and the *D. regia* trypsin inhibitor (Hung et al., 2007).

The expressed reILTI proved to be as effective at inhibiting of bovine tryptic activity as was the native protein (Fig. 13A). Additionally, reILTI was able to inhibit the trypsin-like enzymes of the midgut from *D. saccharalis* and *H. virescens* larvae (Fig. 13B). These results demonstrated the moderate and strong inhibitory capacity of reILTI when used for anti-tryptic assays *in vitro* against the proteinases of *D. saccharalis* and *H. virescens* midguts, respectively. This anti-tryptic activity profile of reILTI was similar to that of native ILTI when tested *in vitro* using midguts from *D. saccharalis* and *H. virescens* (see control line in Fig. 9A and B, respectively). However, when ILTI was added to the larval diet, it did affect insect development, as verified by a drastic weight reduction and an efficient inhibitory activity. Based on these results, we suggest that reILTI could exert insecticide activity when incorporated in an artificial diet, which is the aim of further studies.

In summary, in this work (i) the antimetabolic property of ILTI was verified, (ii) the *ilti* nucleotide sequence was determined, and (iii) the inhibitory activity of the expressed protein was detected. We consider that the major contribution of this paper is to provide a potential tool for obtaining transgenic plants with higher resistance to insect attack.

## Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul), PROPP/UFMS (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) and FINEP (Financiamento de Estudos e Projetos/Ministério da Ciência e Tecnologia).

## References

- Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, E., Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S., 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Mol. Biol.* 57, 189–202.
- Alfonso-Rubí, J., Ortego, F., Castañera, P., Carbonero, P., Díaz, I., 2003. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in *indica* and *japonica* rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Transgenic Res.* 12, 23–31.
- Babu, S.R., Subrahmanyam, S., 2010. Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 349–358.
- Bhattacharyya, A., Leighton, S.M., Babu, C.R., 2007. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 669–677.
- Bijina, B., Chellappan, S., Basheer, S.M., Elyas, K.K., Bahkali, A.H., Chandrasekaran, M., 2011. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: isolation, purification, and characterization. *Process. Biochem.* 46, 2291–2300.
- Boulter, D., 1993. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry* 34, 1453–1466.
- Bown, D.P., Wilkinson, H.S., Gatehouse, J.A., 2004. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. *Physiol. Entomol.* 29, 278–290.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Breiteneder, H., Radauer, C., 2004. A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 821–830.
- Brioschi, D., Nadalini, L.D., Bengtson, M.H., Sogayar, M.C., Moura, D.S., Silva-Filho, M.C., 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsin and chymotrypsin allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1283–1290.
- Brito, L.O., Lopes, A.R., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C., 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Physiol. B* 128, 365–375.
- Broadway, R.M., Duffey, S.S., 1986. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 32, 673–680.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties, a review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicol.* 40, 1515–1539.

- Coelho, M.B., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2007. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 406–414.
- De Leo, F., Bonadé-Bottino, M.A., Ceci, L.R., Gallerani, R., Jouanin, L., 1998. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiol.* 118, 997–1004.
- Dunse, K.M., Stevens, J.A., Lay, F.T., Gaspar, Y.M., Heath, R.L., Anderson, M.A., 2010. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *PNAS* 107, 15011–15015.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271–278.
- Falco, M.C., Silva, F.M.C., 2003. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 761–766.
- Fan, S.G., Wu, G.J., 2005. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, 273–292.
- Farrar, R.R., Barbour, J.D., Kenedy, G.G., 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82, 593–598.
- Ferry, N., Edwards, M.G., Gatehouse, T., Campell, P., Christou, P., Gatehouse, A.M.R., 2006. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. *Transgenic Res.* 15, 13–19.
- Fitt, G.P., 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 17–52.
- Garcia, V.A., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthus parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteinases. *Protein J.* 23, 343–350.
- Gatehouse, J.A., 2011. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 409–416.
- Girard, C., Le Metayer, M., Bonadé-Bottino, M., Pham-Delegue, M.H., Jouanin, L., 1998a. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 229–237.
- Girard, C., Le Metayer, M., Zaccomer, B., Bartlett, E., Williams, I., Bonadé-Bottino, M., Pham-Delegue, M.H., Jouanin, L., 1998b. Growth stimulation of beetle larvae reared on transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. *J. Insect Physiol.* 44, 263–270.
- Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Deshpande, V.V., Sainani, M.N., Gupta, V.S., Ranjekar, P.K., 1998. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiol.* 116, 393–401.
- Giri, A.P., Chougule, N.P., Telang, M.A., Gupta, V.S., 2005. Engineering insect tolerant plants using plant defensive proteinase inhibitors. *Phytochemistry* 8, 117–137.
- Gomes, C.E.M., Barbosa, A.E.A.D., Macedo, L.L.P., Pitanga, J.C.M., Moura, F.T., Oliveira, A.S., Moura, R.M., Queiroz, A.F.S., Macedo, F.P., Andrade, L.B.S., Vidal, M.S., Sales, M.P., 2005. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). *Plant Physiol. Biochem.* 43, 1095–1102.
- Gotor, C., Pintor-Toro, J.A., Romero, L.C., 1995. Isolation of a new member of the soybean Kunitz-type proteinase inhibitors. *Plant Physiol.* 107, 1015–1016.
- Harsulkar, A.M., Giri, A.P., Patankar, A.G., Gupta, V.S., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K., Deshpande, V.V., 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa armigera*. *Plant Physiol.* 121, 450–497.
- Hartl, M., Giri, A.P., Kaur, H., Baldwin, I.T., 2010. Serine proteinase inhibitors specifically defend *Solanum nigrum* against generalist herbivores but do not influence plant growth and development. *Plant Cell* 22, 4158–4175.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Boulter, D., 1993. Transgenic plants conferring insect tolerance: proteinase inhibitor approach. *Transgenic Plants Eng. Util.* 1, 317–338.
- Hung, C.H., Peng, P.H., Huang, C.C., Wang, H.L., Chen, Y.J., Chen, Y.L., Chi, L.M., 2007. Genomic and cDNA cloning, characterization of *Delonix regia* trypsin inhibitor (DrTI) gene, and expression of DrTI in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 98–103.
- Jongsma, M.A., Bolter, C.J., 1997. The adaptation of insects to plant proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 885–896.
- Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch, D., Stiekema, W.J., 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8041–8045.
- Kim, J.Y., Park, S.C., Kim, M.H., Lim, H.T., Park, Y., Hahn, K.S., 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin proteinase inhibitor obtained from potato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 921–927.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lingaraju, M.H., Gowda, L.R., 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *BBA* 1784, 850–855.
- Lopes, J.L.S., Valadares, N.F., Moraes, D.J., Rosa, J.C., Araújo, H.S.S., Beltrami, I.M., 2009. Physico-chemical and antifungal properties of proteinase inhibitors from *Acacia plumase*. *Phytochemistry* 70, 871–879.
- Lorenzi, H., 2002. 2a ed. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. 2. Editora Plantarum, Nova Odessa. 368 pp.
- Macedo, M.L.R., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Xavier-Filho, J., 1993. Vicilins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 105, 89–94.
- Macedo, M.L.R., Mello, G.C., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., Matos, D.G.G., 2002. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 891–898.
- Macedo, M.L.R., Garcia, V.A., Freire, M.G.M., Richardson, M., 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry* 68, 1104–1111.
- Macedo, M.L.R., Pando, S.C., Chevreuril, L.R., Marangoni, S., 2009. Properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds against digestive proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Protein Pept. Lett.* 16, 1459–1465.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Franco, O.L., Migliolo, L., Oliveira, C.F.R., 2011. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 158, 164–172.
- Major, I.L., Constabel, C.P., 2008. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivore. *Plant Physiol.* 146, 888–903.
- Marchetti, S., Delledonne, M., Fogher, C., Chiabà, C., Chiesa, F., Savazzini, F., Giordano, A., 2000. Soybean Kunitz, C-II and PI-IV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.* 101, 519–526.
- Michaud, D., 1997. Avoiding proteinase-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends Biotechnol.* 15, 4–6.
- Mordue (Luntz), A.J., Blackwell, A., 1993. Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39, 903–924.
- Oliva, M.I.V., Silva, M.C.C., Sallai, R.C., Brito, M.V., Sampaio, M.U., 2010. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie* 11, 1667–1673.
- Oliveira, A.S., Migliolo, L., Aquino, R.O., Ribeiro, J.K.C., Macedo, L.L.P., Andrade, L.B.S., Bemquerer, M.P., Santos, E.A., Kiyota, S., Sales, M.P., 2007. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7342–7349.
- Parde, V.D., Sharma, H.C., Kachole, M.S., 2010. *In vivo* inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 56, 1315–1324.
- Parra, J.R.P., 1998. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, pp. 1015–1038.
- Parra, J.R.P., Mihsfeldt, L.H., 1992. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. *Adv. Insect Rearing Res. Pest Manag.* 195–209.
- Pompermyer, P., Lopes, A.R., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C., 2001. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 99, 79–85.
- Pompermyer, P., Falco, M.C., Parra, J.R.P., Silva-Filho, M.C., 2003. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. *Entomol. Exp. Appl.* 109, 217–224.
- Rayapuram, C., Baldwin, I.T., 2006. Using nutritional indices to study LOX3-dependent insect resistance. *Plant Cell Environ.* 29, 1585–1594.
- Roy, S., Dutta, S.K., 2009. Genomic and cDNA cloning, expression, purification, and characterization of chymotrypsin–trypsin inhibitor from *Winged Bean* seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2671–2676.
- Ryan, C.A., 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425–449.
- Silva, W., Freire, M.G.M., Parra, J.R.P., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2011. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. *Process. Biochem.* 47, 257–263.
- Song, S.I., Kim, C.H., Baek, S.J., Choi, Y.D., 1993. Nucleotide sequences of cDNAs encoding the precursors for soybean (*Glycine max*) trypsin inhibitors (Kunitz type). *Plant Physiol.* 101, 1401–1402.
- Telang, M., Srinivasan, A., Patankar, A., Harsulkar, A., Joshi, V., Damle, A., Deshpande, V., Sainani, M., Ranjekar, P., Gupta, G., Birah, A., Rani, S., Kachole, M., Giri, A., Gupta, V., 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry* 63, 643–652.
- Telang, M.A., Giri, A.P., Pyati, P.S., Gupta, V.S., Tegeder, M., Franceschi, V.R., 2009. Winged bean chymotrypsin inhibitors retard growth of *Helicoverpa armigera*. *Gene* 431, 80–85.
- Waldbauer, G.P., 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.* 5, 229–288.
- Yang, L., Fang, Z., Dicke, M., van Loon, J.J.A., Jongsma, M.A., 2009. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 55–61.
- Zhang, D., Yang, Y., Castlebury, L.A., Cerniglia, C.E., 1996. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 216–265.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "CLONAGEM, EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Inga laurina* EM RELAÇÃO AOS INSETOS PRAGAS *Diatraea saccharalis* E *Heliothis virescens*":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

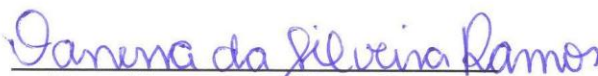
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( X ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2011/03, Instituição: Instituto de Biologia/Unicamp.

( ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

  
Aluno: Vanessa da Silveira Ramos



Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido ( ) Indeferido



Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI  
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança  
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura