

**TEGUMENTOS DE SEMENTES NÃO-HOSPEDEIRAS COMO
BARREIRAS CONTRA A PENETRAÇÃO DO BRUQUÍDEO
Callosobruchus maculatus: ÊNFASE NO TEGUMENTO DE
SEMENTES DE *Albizia sp***

Amanda Jardim de Souza

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF
Campos dos Goytacazes – RJ

MARÇO DE 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

TEGUMENTOS DE SEMENTES NÃO-HOSPEDEIRAS COMO
BARREIRAS CONTRA A PENETRAÇÃO DO BRUQUÍDEO
Callosobruchus maculatus: ÊNFASE NO TEGUMENTO DE
SEMENTES DE *Albizia sp*

Amanda Jardim de Souza

Orientadora: Dr^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira

**Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biociências e
Biotecnologia.**

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Química e Função de Proteínas e
Peptídeos – LQFPP, do Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB

Campos dos Goytacazes - RJ

Março de 2009

TEGUMENTOS DE SEMENTES NÃO-HOSPEDEIRAS COMO
BARREIRAS CONTRA A PENETRAÇÃO DO BRUQUÍDEO
Callosobruchus maculatus: ÊNFASE NO TEGUMENTO DE
SEMENTES DE *Albizia sp*

Amanda Jardim de Souza

Aprovada em 17 de março de 2009

Comissão Examinadora:

Dr. José Roberto da Silva (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Dra. Valdirene Moreira Gomes (LFBM – CBB - UENF)

Dr. Francisco José Alves Lemos (LBT – CBB - UENF)

Orientadora: Dr^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira (LQFPP/CBB/UENF)

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se tornam em golpes fatais... Mas se eu tiver grandes sonhos, meus erros produzirão crescimento, meus desafios produzirão oportunidades e meus medos produzirão coragem... Por isso nunca desisto de meus sonhos!”

Augusto Cury

Dedico a meu Deus: meu Pai, meu Amigo, minha Companhia e Razão da minha vida! Obrigada por sonhar esse sonho comigo e me permitir vencer esse desafio! Eu te amo independente das circunstâncias ao meu redor!

Aos meus sobrinhos amados: Estevão, Pedro, Lucas, Rebeca e Julia, por me impulsionarem em cada momento que pensei em desistir dessa caminhada, seus pequenos gestos mudaram minhas expectativas!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus-Pai, a quem nunca terei como retribuir tanto amor por mim.

À professora Elenir pela orientação tão dedicada a mim durante todos esses anos em que estivemos juntas. Obrigada por gastar seu tempo investindo em mim, pela confiança, pelo carinho e preocupação com a minha vida, não só no aspecto profissional, mas pessoal também! Nunca vou me esquecer de você! Muito obrigada mesmo!

À Patrícia (minha co-orientadora), como é bom tê-la comigo, minha amiga! Obrigada por suas orações! A caminhada tornou-se mais fácil com você ao meu lado!

A toda a galera da sala 224 (nosso laboratório!): Elane, Simone, Jamile, Mariana, Bárbara, Tierry, Diego e Sheila por tudo que fizeram por mim! Seria impossível ter me sentido tão bem aqui se vocês não tivessem tornado o ambiente tão agradável!

À Simone, minha irmã em Cristo, minha amiga, como foi bom ter seus ouvidos para compartilhar minhas dificuldades e alegrias! Eu agradeço a Deus pela sua vida!

À Bárbara Cunha, minha companheira de sempre!!! Você foi um presente que Deus me deu para me desafiar a crescer! Perto ou longe, sempre estaremos juntas!

À Sheila, pelo toque que deu ao meu trabalho! O que seria de minhas larvas ultra-microscópicas se você não as dissecasse! Brigadão! À Elane que por tantas vezes foi prestativa. Obrigada pelos ensinamentos nas técnicas. Aprendi e cresci muito com nossas diferenças. Valeu por tudo!

À Dona Ednalva e a Jamile que fizeram parte de um momento tão novo de minha vida e me aceitaram no seu lar. Muito obrigada por tudo que dividiram comigo!

Aos demais colegas do Setor de Bioquímica de Plantas do LQFPP: Márcio, Lucilene, Nathália, Nadia e Gustavo, pelo agradável convívio no ambiente de trabalho. E aos técnicos do laboratório: Cristóvão, Sheila, Jucélia, Isabela por se disponibilizarem a me ajudarem sempre que precisei!

A Nathália e o Caio que formam um casal nota 1000! Nath, se fosse agradecer tudo que você já me fez...! Brigadão por tudo mesmo!!!

À professora Dra. Kátia Valevski por tantos ensinamentos gerados ao longo da minha vida aqui no laboratório! Obrigada pela atenção e ainda muito obrigada por aceitar revisar minha dissertação!

Ao professores Dr. José Roberto (Beto), Dra. Valdirene Gomes e Dr. Francisco José (Franzé) por aceitarem gentilmente compor minha banca examinadora.

Aos Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e Dr. Jonas Perales, da FIOCRUZ por colaborarem tanto no meu trabalho, aceitando fazer as análises de espectometria de massas.

Às meninas da República: Nadia (Irmã mais nova!) e Paola (Mãe), obrigada por se tornarem parte da minha família. Vocês são especiais demais e nunca as esquecerei!

A toda minha família que torceu por essa vitória, em especial a minha MÃE que sempre sonhou que crescêssemos na vida! A maior das heranças que poderia ter deixado foi a que desenvolveu dentro de mim: Dignidade. Eu te amo!

Ao meu avô José Jardim e minha avó Luzia Maciel, pelo carinho dedicado a mim, de forma incondicional. Ao meu pai José e meus avós Minzinho e Ediméia (*in memorian*), que gostaria que estivessem aqui para compartilharem comigo a alegria dessa conquista.

Aos meus irmãos Josiany, Priscila e Otávio, que sempre estiveram ao meu lado. Eu amo vocês e sou grata pelo amor de vocês por mim.

Aos grandes amigos de longa data: Michele, Cristiane, Fabiana, Juliana e Reginaldo (Ceará). A vida tornou-se muito mais agradável com vocês ao meu lado!

A meus irmãos da *Igreja Metodista Wesleyana*, por tanto carinho e amor demonstrados a mim, em especial ao Pastor Evaldo pela amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e ajudaram na realização desse trabalho.

SUMÁRIO	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	XVI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Classificação dos Mecanismos de Defesa das Plantas	2
1.2 – Sementes	3
1.2.1 – Tegumento de Sementes	4
1.3 – <i>Callosobruchus maculatus</i>	6
1.4 - Proteinases Cisteínicas	9
1.4.1 – Proteinases Cisteínicas e suas Funções em Defesa de Plantas	9
1.5 – Globulinas	10
1.5.1 – Globulinas e suas Funções na Defesa de Plantas	12
2 – OBJETIVOS	13
2.1 – Objetivo Geral	13
2.2 – Objetivos Específicos	13
3 – MATERIAIS	14
3.1 - Materiais Biológicos	14

3.1.1- Sementes	14
3.1.2- Insetos	14
3.1.3 - Anticorpos	14
3.2 – Principais Reagentes	15
3.3 – Principais Equipamentos	15
4 – MÉTODOS	16
4.1 – Criação de Insetos	16
4.2 - Infestação de Sementes Naturais com <i>C. maculatus</i> e Acompanhamento do Desenvolvimento das larvas	16
4.3 – Infestação de Sementes Artificiais Recobertas com Tegumentos Naturais com <i>C. maculatus</i>	16
4.4 – Obtenção da Farinha e Extração de Proteínas do Tegumento de Sementes de <i>Albizia sp</i>	19
4.5 – Ensaio Biológico para Avaliar a Toxicidade das Farinhas e Frações para <i>C. maculatus</i>	21
4.6 – Cromatografia de Troca Iônica	21
4.7 - Cromatografia de Exclusão Molecular	22
4.8 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)	22
4.9 – Análise por Espectrometria de Massas de Proteínas Visualizadas por SDS-PAGE	23
4.10 – Ensaio <i>in vitro</i> de Atividade de Proteinase Cisteínica do Tipo Papaína	24
4.11 – Atividade de Proteinases Cisteínicas em Gel de Poliacrilamida Contendo Gelatina	25
4.12 – Dissecação das larvas e experimentos de permeabilidade	26

4.13 – Análise das propriedades de ligação à quitina das proteínas das frações CI e SI	27
4.14 - Dosagem de vicilina pelo método de ELISA	27
5 - RESULTADOS	29
5.1– Acompanhamento do desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes naturais, da postura até a penetração do tegumento	29
5.2 – Performance de <i>C. maculatus</i> infestando sementes naturais não hospedeiras	39
5.3 – Infestação de sementes artificiais recobertas com tegumento de sementes de soja (<i>Glycine max</i>) com <i>C. maculatus</i>	42
5.4 – Toxicidade do tegumento de sementes de <i>Albizia sp</i> para <i>C. maculatus</i>	44
5.5 – Fracionamento do tegumento de sementes de <i>Albizia sp</i> em coluna de troca iônica em CM-Sepharose	46
5.6 – Toxicidade das frações cromatográficas de troca iônica em CM-Sepharose para <i>C. maculatus</i>	46
5.7 – Análise do perfil protéico da fração CI (não-retido) em SDS-PAGE e identificação das proteínas por espectrometria de massas em MALDI-TOF	49
5.8 - Atividade de Proteinase Cisteínica em órgãos e tecidos de larvas de <i>C. maculatus</i>	52
5.9 – Avaliação da permeabilidade da membrana intestinal das larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com a fração CI	54
5.10 – Análise da capacidade de ligação à quitina das proteínas da fração CI	56
5.11 – Perfil Cromatográfico da fração CI em Exclusão Molecular	58
5.12 - Efeito da fração SI sobre o desenvolvimento das larvas de <i>C. maculatus</i>	58
5.13 – Identificação das proteínas da fração SI por espectrometria de massas em MALDI-TOF	61

5.14 - Dosagem de proteinases cisteínicas e vicilinas nas frações CI e SI	63
5.15 - Análise da capacidade de ligação à quitina das proteínas da fração SI	65
6 – DISCUSSÃO	67
7 – CONCLUSÕES	76
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1 Bruquídeo <i>Callosobruchus maculatus</i> infestando sementes de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>)	8
Figura 2 Modelo de sementes artificiais recobertas com tegumentos naturais. A: Sementes artificiais recobertas com tegumento natural de <i>C. ensiformis</i> . B: Sementes artificiais recobertas com tegumento natural de <i>V. unguiculata</i>	18
Figura 3 Esquema de extração de proteínas do tegumento de sementes de <i>Albizia sp</i>	20
Figura 4 Desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i>	32
Figura 5 Desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (cultivar Manteiga)	33
Figura 6 Desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (cultivar Vermelho)	34
Figura 7 Desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes de <i>Vigna vexilata</i>	35
Figura 8 Desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes de <i>Vigna angularis</i>	36
Figura 9 Desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes naturais de <i>Albizia sp</i>	37
Figura 10 Desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> em sementes naturais de soja, do 1º dia após oviposição até o 14º dia de desenvolvimento	38
Figura 11 Desenvolvimento e sobrevivência de <i>C. maculatus</i> em sementes naturais de <i>V. unguiculata</i> (controle positivo) e em sementes não-hospedeiras de diferentes espécies e cultivares de sementes de soja (<i>Glycine max</i>)	41

Figura 12	Desenvolvimento e sobrevivência de larvas de <i>C. maculatus</i> em sementes artificiais recobertas por tegumento de sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> (semente controle) e de cultivares de soja comercial, Elite, Conquista, Tucunare, UFV florestal, UFUS 2003 e UFUS 2005	43
Figura 13	Toxicidade do tegumento de <i>Albizia sp</i> para <i>C. maculatus</i>	45
Figura 14	Cromatografia de troca iônica do precipitado 0-90% em coluna de CM-Sepharose	47
Figura 15	Efeito da fração CI (não-retida) da cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i>	48
Figura 16	Perfil protéico da fração CI por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	50
Figura 17	Atividade de proteinases cisteínicas nos tecidos internos ou órgãos de larvas de 16 dias de <i>C. maculatus</i> controle ou alimentadas com a fração CI 0,1%	53
Figura 18	Larvas de <i>C. maculatus</i> com 16 dias, alimentadas em sementes artificiais contendo 0,1 % da fração CI e 1% do corante blue dextran	55
Figura 19	Cromatografia da fração CI em coluna de quitina e detecção de proteinases cisteínicas e vicilinas nas frações não retidas e retidas	57
Figura 20	Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 da fração CI do tegumento de sementes de <i>Albizia sp</i>	59
Figura 21	Efeito da fração SI sobre o desenvolvimento de larvas de <i>C. maculatus</i>	60
Figura 22	A: Atividade de proteinase cisteínica. B: Dosagem de vicilinas nas frações provenientes das cromatografias de troca iônica (CM-Sepharose) CI e exclusão molecular em Sephacryl S-100, SI do tegumento de sementes de <i>Albizia sp</i>	64

Figura 23 Cromatografia da fração SI em coluna de quitina e detecção de vicilinas nas frações não retidas e retidas 66

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela 1	Identificação, por espectrometria de massas em MALDI TOF, de peptídeos provenientes da hidrólise triptica de bandas protéicas isoladas do tegumento de sementes de <i>Albizia sp</i>	51
Tabela 2	Identificação, por espectrometria de massas em MALDI TOF, de peptídeos provenientes da hidrólise triptica de bandas protéicas da fração SI do tegumento de sementes de <i>Albizia sp</i>	62

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CM-	Carboximetil
CI-	Fração não retida em CM-Sepharose
SI	Fração correspondente ao primeiro pico de CI quando submetida a Sephacryl S-100
EPACE-10-	Genótipo de <i>Vigna unguiculata</i> susceptível ao gorgulho
kDa-	Kilodalton
PBS-	Tampão fosfato salina
SDS-	Dodecil sulfato de sódio
TEMED-	N' N' N' N' tetrametiletilenodiamino
Tris-	Tris-hidroximetil amino etano
TCA	Ácido Tricloroacético
MALDI	“Matrix-assisted laser desorption/ionization”
DTT	1,4 - Dithiothreitol
BSA	Albumina Sérica Bovina
ELISA	“Enzime Linked Immunossorbent Assay”
OPD	Orto fenil diamina

RESUMO

O inseto bruquídeo *Callosobruchus maculatus* representa a principal praga de sementes armazenadas de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda). Entretanto tem sido observado que algumas sementes apresentam resistência natural contra o ataque desse inseto através da combinação de características físicas com moléculas químicas de defesa. O objetivo desse trabalho foi investigar a participação dos tegumentos de sementes como barreiras naturais contra a penetração de *C. maculatus* bem como identificar e isolar proteínas tóxicas do tegumento de sementes de *Albizia sp* para este inseto. Sementes naturais de diversas espécies vegetais foram infestadas com esse inseto e o desenvolvimento larval foi acompanhado. Nossos resultados mostraram que todas as sementes estudadas apresentaram algum grau de influência negativa na oviposição, eclosão e desenvolvimento larval. Quando a interferência específica dos tegumentos nesses eventos foi investigada, observamos que as poucas larvas que atravessaram esses tecidos demoraram um tempo bem superior para alcançarem os cotilédones e após 20 dias suas massas foram reduzidas em até 88 %. O fracionamento do extrato protéico obtido a partir do tegumento de sementes de *Albizia sp* mostrou a presença de proteínas de reserva do tipo vicilina e globulinas 8S bem como de proteinase cisteínica em fração tóxica para o inseto (fração CI). Essas proteínas mostraram capacidade de ligação à quitina indicando um possível mecanismo de ação. Atividade de proteinase cisteínica foi detectada em órgãos de larvas, principalmente associada ao intestino de larvas que se alimentaram dessa fração CI. Por cromatografia de exclusão molecular as proteínas homólogas a proteínas de reserva (vicilinas e globulinas 8S) foram purificadas e suas identidades confirmadas por espectrometria de massas. A fração contendo apenas essas proteínas foi bastante tóxica para o inseto e por cromatografia de afinidade foi novamente observada que essas proteínas se ligam à quitina. Esses resultados confirmam a eficiência dos tegumentos como barreiras para a penetração do inseto assim como mostra a presença de proteínas tóxicas nesses tecidos, reforçando a hipótese de que esse tecido seja não só uma barreira física eficiente, mas também uma forte barreira química empregada para a proteção da semente.

ABSTRACT

The bruchid insect *Callosobruchus maculatus* represents the main pest of stored seeds of *Vigna unguiculata* (cowpea). However it been observed that some seeds present natural resistance against the attack of this insect through a combination of physical characteristics and chemical defensive molecules. The objective of this work was to investigate the participation of the seed coat as a natural barrier against the penetration of *C. maculatus* as well as to identify and isolate toxic proteins of *Albizia sp* seed coat towards this insect. Natural seeds from several species were infested with this insect and the larval development was followed. Our results show that all the studied seeds presented some degree of negative influence on the oviposition, eclosion and larval development. When the specific interference of seed coats over these events was investigated, it was noticed that the few larvae that crossed these tissues spent much more time to reach the cotyledons than and after 20 days their masses were reduced in up to 88%. Fractioning of the *Albizia sp* seed coat protein extract showed the presence of vicilin-type and 8S reserve globulins as well as of cysteine proteinases in the major toxic fraction for the insect (CI fraction). These proteins show the capacity of binding to chitin, indicating a possible mechanism of action. Cysteine proteinase activity was detected in larvae organs, mainly associate to the intestine of larvae fed of the CI fraction. By molecular exclusion chromatography the homologous reserve proteins (vicilins and 8S globulins) were purified and their identities were confirmed by mass spectrometry. The CI fraction, containing just these proteins, was highly toxic for the insect and by affinity chromatography again was observed that these proteins are capable to bind the chitin. These results confirm the efficiency of the seed coat as a barrier for the insect penetration, by showing the presence of toxic protein in these tissues. They therefore confirm the hypothesis that this tissue is more than an efficient physical barrier, it is also a strong chemical barrier employed for the seed protection.

1 – INTRODUÇÃO

As sementes são consideradas pedras fundamentais para a formação das civilizações, já que depois de se descobrir que estas representavam uma fonte de alimentação segura, o homem mudou seus hábitos nômades, tornando-se sedentário. A agricultura representa, desde a antiguidade, uma atividade sócio-econômica de extrema importância para a humanidade, proporcionando fonte de alimento. Seu início certamente se deu quando o homem começou a fazer uso de sementes na alimentação (Xavier-Filho, 1993).

Apesar disso, a agricultura tem sua produção freqüentemente comprometida, devido a danos acarretados pelo ataque de várias pestes e patógenos. Estas incluem insetos, nematódeos, além de doenças causadas por vírus, bactérias e fungos (Oerke *et al.*, 1994; Gomes & Xavier-Filho, 1994). Produtos agrícolas estocados são atacados por mais de 600 espécies de insetos, acarretando danos qualitativos e quantitativos. Essas perdas na produção agrícola devidas ao ataque de insetos, sem o uso de inseticidas, têm sido estimadas em torno de 70 % (Araújo *et al.*, 2005)

Durante anos, o controle de pragas e patógenos têm sido feito com o uso de agrotóxicos. Entretanto a utilização destes apresenta muitas desvantagens como alto custo financeiro, seleção de pestes e patógenos resistentes, acúmulo de resíduos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos no meio ambiente, o que significa prejuízos à natureza (Fields *et al.*, 2001). Apesar do uso de inseticidas, as perdas na pré e pós-colheita ocasionadas pelo ataque de insetos ainda é em torno de 15 % da produção total (Araújo *et al.*, 2005)

Uma alternativa para o método químico convencional usado atualmente para o controle de pragas e patógenos é o desenvolvimento de variedades resistentes, através de manipulação genética com a inserção de genes identificados como envolvidos nas respostas de defesa de plantas (Appleby & Credland, 2004), o que vem estimulando os estudos dos mecanismos naturais de resistência (Kornegay *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1995). Dentre as vantagens dessa técnica, incluem-se a diminuição do uso de inseticidas, reduzindo os custos para o agricultor e os danos pra saúde e meio ambiente (Mazzonetto & Vendramim, 2002).

1.1 – CLASSIFICAÇÃO DOS MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

A interação planta-agressor representa um sistema dinâmico, que está sujeito a contínuas variações e mudanças. Nesse processo, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa para reduzir as agressões, incluindo barreiras químicas e físicas (Haruta *et al.*, 2001). Em contrapartida, para superar as barreiras defensivas das plantas, os insetos, por exemplo, desenvolveram várias estratégias de alimentação, desenvolvimento e reprodução (Mello & Silva-Filho, 2002).

As defesas de plantas podem ser agrupadas, de acordo com a natureza do mecanismo envolvido, em 2 grupos principais: (1) defesas estruturais, que são aquelas que atuam como barreiras físicas, e previnem contra o ataque de insetos e a penetração de patógenos; e (2) defesas químicas, que envolvem a ação de componentes tóxicos a pestes e patógenos, inibindo o desenvolvimento dos mesmos (Agrios, 1988; Xavier-Filho, 1993). As defesas das plantas podem ser ainda classificadas em induzidas, se são sintetizadas em resposta a estímulos ambientais, como por exemplo, a indução de síntese de inibidores de proteases por uma planta de tomate que tem sua folha mastigada por uma lagarta, ou em constitutivas, aquelas que já fazem parte do plano de desenvolvimento da planta e são depositadas durante sua formação. As sementes maduras só possuem as defesas constitutivas (Xavier-Filho, 1993). Entre estas defesas encontram-se principalmente o acúmulo de várias proteínas armazenadas com propriedades inseticidas e microbicidas (Xavier-Filho, 1993).

Dentre as proteínas que têm sido relatadas como envolvidas nos processos de mecanismos de defesa das plantas podemos citar diversas, cada uma com diferentes níveis e especificidades de efeitos deletérios sobre insetos e patógenos. Incluem-se as lectinas (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Sadeghi *et al.*, 2006), proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 1 e do tipo 2 (Van Dame *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2001), inibidores de enzimas proteolíticas (Silva & Xavier Filho, 1991; Pedra *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Bahagiawati *et al.*, 2007), quitinases (Gijzen *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2008) e formas variantes de proteínas de reserva (Macedo *et al.*, 1993; Sales *et al.*, 2000), como vicilinas (proteínas de reserva do tipo 7S), capazes de se ligarem a estruturas quitinosas do intestino médio de larvas de *Callosobruchus maculatus*, interferindo no seu

desenvolvimento e ainda sendo tóxicas a larvas de *Zabrotes subfasciatus* (Sales *et al.*, 2000; Sales *et al.*, 2005).

Um novo grupo de proteínas que recentemente tem sido descoberto como envolvidas em defesa de plantas são as proteinases cisteínicas (Mohan *et al.*, 2006).

1.2 – SEMENTES

A semente é uma estrutura de extrema importância no desenvolvimento de plantas superiores, sendo esse desenvolvimento largamente determinado por características fisiológicas e bioquímicas da semente. Um elemento chave para o sucesso no estabelecimento de um novo indivíduo inclui fatores como a adaptação da semente ao ambiente e a reserva nutritiva que estas contêm, responsáveis por sustentar a jovem planta nos seus estágios iniciais de desenvolvimento até que se torne auto-sustentável, capaz de utilizar a luz solar em processos de fotossíntese (Bewley & Black, 1994).

A semente é uma unidade reprodutora que contém um embrião e reservas de alimentos e, representa a mais importante inovação na evolução das plantas vasculares, sendo fator responsável pela dominância que as plantas com sementes têm atualmente (Xavier-Filho, 1993).

A riqueza das sementes em nutrientes faz delas um excepcional alimento para uma grande variedade de pestes e patógenos, sendo por isso uma das partes das plantas mais visadas por predadores. As sementes maduras, por se encontrarem em estado de dormência, são incapazes de disparar mecanismos de defesas induzidos pelo ataque de predadores, desta forma suas defesas são exclusivamente do tipo constitutivas (Xavier-Filho, 1993). As sementes desempenham ainda papel fundamental no desenvolvimento das civilizações por serem usadas na alimentação humana e animal, na fabricação de produtos naturais e na medicina tradicional (Moise *et al.*, 2005).

1.2.1 – TEGUMENTO DE SEMENTES

O tegumento é a estrutura externa que delimita a semente, sendo desenvolvido a partir dos integumentos do óvulo. Tal desenvolvimento têm profundos efeitos na estrutura final, composição e função, bem como no padrão de maturação do tegumento (Moise *et al.*, 2005).

Antigamente, acreditava-se que o tegumento estivesse envolvido apenas com a proteção física dos tecidos meristemáticos e de reserva contra choques e abrasões (Kozlowski, 1972). Entretanto, sabe-se que o tegumento tem outras funções como: proteger o embrião, garantindo a sobrevivência da espécie, proteger a semente contra estresses bióticos e abióticos presentes no meio (Bewley, 1997) promover o direcionamento de nutrientes para suprir o embrião (Weber *et al.*, 2005), além de controlar processos de dormência/germinação, determinando as condições ambientais adequadas para viabilidade e crescimento da nova espécie (Bewley, 1997).

Dentre os produtos sintetizados por esse tecido, incluem-se tanto componentes de defesa como aqueles com função de controle do desenvolvimento (Moise *et al.*, 2005). O tegumento contém principalmente carboidratos, entretanto constituintes como taninos, lipídeos, proteínas e outros compostos nitrogenados como aminoácidos não-protéicos, alcalóides e amins podem fazer parte de sua composição química (Kozlowski, 1972).

O tegumento sendo a cobertura externa das sementes é o principal modulador das interações entre o embrião e o ambiente externo, desta forma é então a primeira parte da semente a entrar em contato com os possíveis agressores. Inicialmente a participação do tegumento nos mecanismos de defesa das sementes era relacionada unicamente à sua dureza e principalmente à sua espessura. Estudos feitos com *Callosobruchus maculatus* infestando sementes não-hospedeiras de 73 espécies diferentes, sugeriram que compostos químicos do tegumento poderiam estar envolvidos nos mecanismos de resistência dessas sementes (Janzen, 1977). Neste trabalho, foi analisada a relação entre a espessura e dureza dos diferentes tegumento com a sobrevivência ou morte das larvas desse bruquídeo, durante seus primeiros estágios de desenvolvimento. Para as sementes de *Erythrina berteroana* e *Ormosia venezolana*, observou-se uma alta mortalidade das larvas do inseto quando da passagem pelo tegumento,

apesar dessas sementes possuírem tegumentos muito finos. Foi observado também que esse bruquídeo teve sucesso na predação de sementes que possuíam tegumentos extraordinariamente espessos e duros (Janzen, 1977).

Essas observações inspiraram estudos subsequentes voltados à exploração do envolvimento de compostos químicos do tegumento nos mecanismos de resistência de sementes ao ataque de algumas espécies de herbívoros e patógenos. Como exemplo cita-se o trabalho de Thiery, (1984), onde foi visto consideráveis variações na mortalidade no primeiro estágio larval de desenvolvimento do inseto *Acanthoscelides obtectus*, em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Thiery, 1984).

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram a presença de proteínas no tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis* (Oliveira *et al.*, 1999), *Phaseolus lunatus* (Moraes *et al.*, 2000) e *Phaseolus vulgaris* (Silva *et al.*, 2004), que apresentaram homologia de seqüência de aminoácidos com vicilinas (proteínas de reserva do tipo globulinas 7S) e foram tóxicas ao bruquídeo *C. maculatus*, quando incorporadas em sementes artificiais. Santos (2004) também observou a presença de compostos tóxicos do tegumento de soja, compostos esses que foram capazes de inibir o desenvolvimento do inseto *C. maculatus* e o crescimento de fungos fitopatogênicos.

Do tegumento de sementes de *C. ensiformis*, também foi isolado um carboidrato de massa molecular de 883,0 Da, constituído por uma cadeia principal de unidades de ramnose unidas por ligações do tipo α (1 \rightarrow 2) com ramificações não redutoras de galactose com ligações do tipo α (1 \rightarrow 4). Esse carboidrato também apresentou toxicidade para larvas de *C. maculatus*, quando incorporado em sistema de sementes artificiais em concentrações inferiores a 2 % (Oliveira *et al.* 2002).

Nosso grupo também observou a presença de duas frações protéicas obtidas do tegumento de sementes de *Albizia sp*, que quando incorporadas em sementes artificiais, mostraram-se extremamente tóxicas a *C. maculatus* (Souza, 2006). Esses resultados nos indicam que tanto sementes cultivadas, como soja e diferentes tipos de sementes do gênero *Phaseolus*, como sementes não-domesticadas, como é o caso de *Albizia sp* e *Canavalia ensiformis*, acumulam compostos protéicos no tegumento, com potencial toxicidade para insetos e fungos.

Santos *et al.* (2008) identificaram proteínas do tegumento de soja (*Glycine max*) com atividade anti-fúngica, que foram capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos como *Fusarium lateritium* e *Fusarium oxysporium*. Na fração antifúngica constatou-se a presença de peroxidase, vicilina e uma proteína de 24 kDa homóloga a fosfatase ácida, as quais parecem proteger a semente da colonização por fungos fitopatogênicos. Quitinases do tegumento de soja também mostraram-se tóxicas a *C. maculatus*, e apesar de não terem inibido o crescimento das leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* e nem dos fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, foi observada uma fraca inibição do crescimento para os fungos filamentosos *Colletotrichum musae*, *Rhizoctania fragariae* e *Trichoderma pseudokoningii* (Conceição, 2008).

A importância de se estudar o tegumento advém do quanto esse tecido tem sido negligenciado em estudos direcionados à defesa de plantas. Muito do que se sabe e do que é descrito atualmente na literatura baseia-se em estudos focados nos cotilédones de sementes, sendo que o estudo de proteínas tóxicas dos tegumentos pode nos oferecer uma valiosa ferramenta, já que o tegumento é o primeiro tecido da semente a entrar em contato com o agressor. O reforço dos mecanismos de defesa nestes tecidos pode garantir uma proteção mais eficiente do que a expressão de proteínas de defesa nos cotilédones. Desta forma, as barreiras químicas de defesa das sementes seriam antecipadas para o tegumento, estrutura mais externa evitando danos causados ao embrião.

O conhecimento sobre os mecanismos químicos de tegumentos envolvidos na defesa de semente na proteção contra o ataque de insetos e sua validação como barreira contra a penetração destes, pode representar uma nova ferramenta para a transformação de plantas, contribuindo para reduzir as perdas na produção agrícola ocasionada pelo ataque de insetos.

1.3 – *Callosobruchus maculatus*

O inseto *C. maculatus* (Figura 1), popularmente chamado de caruncho ou gorgulho do feijão, pertence à família Bruchidae, ordem Coleóptera e destaca-se como a principal praga dos grãos armazenados de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda), afetando gravemente a qualidade do produto. O desenvolvimento de apenas uma larva em grãos de feijão-de-corda pode levar a perda de peso de 8-

22 %, causando até 37 % de perda de produção (Murad *et al.*, 2006). Em períodos de grave infestação, perdas causadas por *C. maculatus* podem alcançar 100 % das sementes armazenadas, dentro de um período de 6 meses (Hall *et al.*, 1997).

Esses insetos têm aproximadamente 3 mm de comprimento, cabeça preta e antenas com 11 segmentos serrilhados, tórax preto com pubescências douradas, apresentando nos élitros manchas amarronzadas, que em repouso formam um “X” (Quintela *et al.*, 1991). A melhor faixa de temperatura para o desenvolvimento desses insetos está compreendida entre 20 e 30°C, com umidade relativa de 60% (Mookherjee & Chawla, 1964), sendo que nesta faixa de temperatura, as fêmeas em média ovipositam 87,2 ovos (Araújo & Watt, 1988). As fêmeas adultas desses insetos fazem a postura na parte externa da semente, o ovo fica aderido ao tegumento e posteriormente a larva penetra na semente, onde completa seu desenvolvimento em aproximadamente 30 dias. O ovo apresenta coloração branca, de forma subelíptica, com comprimento de 0,5 a 0,3 mm. Ao eclodirem, liberam larvas de forma curva e cor branca, que penetram nas sementes consumindo apenas seu conteúdo interior (Southgate, 1979; Credland & Dendy, 1992). No interior das sementes, transformam-se em pupas, que possuem cor marrom, e nos últimos estágios apresentam vestígios de asas, patas e olhos (Bastos, 1981).

O ciclo de vida de *C. maculatus* pode ser dividido em sete estágios: até 8 dias do ciclo (1º instar), 11 dias (2º instar), 13 dias (3º instar), 17 dias (4º instar), 19 dias (pré-pupa) e 24 dias (pupa) e adulto. Após completar o seu desenvolvimento, os insetos adultos emergem deixando galerias nas sementes (Williams, 1980). Os insetos adultos vivem de 5 a 8 dias e apresentam dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos (Quintela *et al.*, 1991).

O ataque deste bruquídeo provoca prejuízos semelhantes aos descritos para o inseto *Zabrotes subfasciatus*, como perda de peso das sementes, redução do poder germinativo e nutritivo, comprometendo assim o valor comercial desses grãos (Gallo *et al.*, 1988). O ataque desse inseto, bem como o de outros insetos-praga, acarreta ainda danos indiretos, relacionados à entrada de microorganismos e ácaros (Rosolem & Marubayashi, 1994). Sementes infestadas com esse bruquídeo sofrem vários danos que levam a diminuição do seu valor comercial, nutricional e principalmente, tem sua capacidade germinativa comprometida (Xavier-Filho, 1993).



Figura 1: Bruquídeo *Callosobruchus maculatus* infestando sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*)

(Fonte:<http://insects.tamu.edu/images/insects/common/images/b-txt/bimg179.html>)

1.4 - PROTEINASES CISTEÍNICAS

Proteinases cisteínicas (EC 3.4.22) são descritas como tióis proteases que exercem função essencial no crescimento e desenvolvimento vegetal, na senescência e morte celular programada, no acúmulo de proteínas de reserva em sementes, e ainda na mobilização dessas reservas. Estas atuam tanto em vias anabólicas quanto em vias catabólicas e em adição estão envolvidas em respostas a estresses bióticos e abióticos (Wisniewski & Zagdanska, 2001).

Proteinases cisteínicas são hidrolases endopeptidases com o resíduo de cisteína no seu sítio ativo (Grudkowska & Zagdanska, 2004) e são geralmente identificadas baseadas no efeito de seus inibidores ativos como iodoacetato, iodoacetamida e E64, e ainda, por terem a característica de ser ativadas pelo grupamento tiol e apresentarem seu pH ótimo numa faixa ácida (Müntz, 1996).

A ocorrência de proteinases cisteínicas em plantas é bastante conhecida e as melhores caracterizadas são aquelas envolvidas em processos de degradação de proteínas durante a germinação, entretanto, pouco se sabe acerca da presença destas proteinases durante o desenvolvimento das sementes e até mesmo em sementes quiescentes (Yamauchi *et al.*, 1992).

Os membros pertencentes ao grupo de proteinases cisteínicas presentes em plantas são representados pelas famílias: papaína, legumaína, caspases, calpaína, proteinases dependentes de cálcio, hidrolases C-terminal ubiquitinas, e proteinases ubiquitina-específicas. Dentre estas, as famílias da papaína (C1) e legumaína (C13) englobam a maior parte das proteinases cisteínicas, sendo a família de proteinases do tipo papaína a mais investigada e melhor descrita dentre todas as proteinases cisteínicas. Essas enzimas participam do “turnover” protéico tanto em animais, como em plantas (Grudkowska & Zagdanska, 2004).

1.4.1 – PROTEINASES CISTEÍNICAS E SUAS FUNÇÕES EM DEFESA DE PLANTAS

Vários trabalhos mostram que a síntese de inibidores de proteinases cisteínicas é disparada pela alimentação de insetos (Ryan, 1990), indicando claramente seus papéis como uma proteína de defesa induzida. Entretanto novos trabalhos mostram que proteinases cisteínicas também acumulam-se em resposta ao ataque de insetos (Pechan *et al.*, 2000). Desta forma as proteinases

cisteínicas, além de atuarem em processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, também atuam em defesa de plantas.

Há pelo menos três ações descritas para proteases nos mecanismos de defesa de plantas: Percepção da aproximação de invasores; regulação de vias sinalizadoras e resposta de defesa, propriamente dito (van der Hoorn & Jones, 2004).

Pelo menos quatro proteinases cisteínicas, do tipo papaína, apresentam atividade defensiva em plantas. O exemplo clássico é a papaína presente no látex de mamão papaya (*Carica papaya*), que é capaz de inibir o crescimento de insetos da ordem Lepidoptera (Konno *et al.*, 2004). Em tomate (*Lycopersium esculentum*), a proteinase cisteínica do tipo papaína RCR3, permite a esta planta proteger-se contra patógenos como o fungo *Cladosporium fulvum* (Krüger *et al.*, 2002). RD21 é outra proteinase cisteínica do tipo papaína de *Arabidopsis*, que parece acumular-se após ataque de insetos (Matsushima *et al.*, 2002). Uma proteinase cisteínica do tipo papaína, com peso molecular em torno de 33 kD, denominada Mir1-CP atua na defesa de milho contra a herbivoria, acumulando-se rapidamente em folhas de milho de genótipos resistentes, em resposta ao ataque de insetos lepidópteros (Pechan *et al.*, 2000). Foi mostrado que quando as larvas de *Spodoptera frugiperda* e outros insetos da Ordem Lepidoptera se alimentavam de folhas de milho de genótipos resistentes, a Mir1-CP rapidamente acumula-se no local atacado pelo inseto. Essa proteinase cisteínica mostrou inibir o crescimento de larvas *in vivo*, por permeabilizar sua membrana peritrófica. Ao perfurar essa membrana, a proteinase cisteínica facilita a absorção de outras proteínas inseticidas pelo intestino médio, tornando o inseto susceptível à ação tóxica dessas proteínas. A inibição da atividade permeabilizadora de Mir1-CP foi prevenida com o uso do inibidor de proteinase cisteínica E-64, indicando que a atividade proteolítica dessas enzimas é requerida para danificar a membrana peritrófica (Mohan *et al.*, 2006; Mohan *et al.*, 2008).

1.5 – GLOBULINAS

As sementes das plantas superiores acumulam grandes quantidades de proteínas de reserva durante o desenvolvimento e maturação. Essas proteínas posteriormente, serão mobilizadas para fornecer matéria-prima e energia necessárias para que ocorra a germinação e crescimento das plântulas (Bewley &

Black, 1994). A maior parte das reservas protéicas em sementes consiste em proteínas de reserva específicas (Shewry & Casey, 1999, citado em Müntz *et al.*, 2001), como as globulinas, que predominam nas sementes de dicotiledôneas, ou as prolamínas que são as principais proteínas de armazenamento em cereais.

As vicilinas (globulinas 7S) formam uma classe bem conhecida de proteínas de reserva de sementes. Estas proteínas constituem até 70% das proteínas presentes nessas sementes (Carasco *et al.*, 1978; Khan *et al.*, 1980). São moléculas oligoméricas, classificadas como globulinas 7S devido a seu grau de sedimentação (Shutov *et al.*, 1995) e apresentam uma composição de aminoácidos com altas concentrações de ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina, fenilalanina e leucina (Carasco *et al.*, 1978; Macedo *et al.*, 1995).

As vicilinas são solúveis em soluções salinas (Fernandes & Xavier-Filho, 1998), não apresentam ligação dissulfeto em suas cadeias polipeptídicas, apresentam grande heterogeneidade (Sales *et al.*, 2000), massa molecular em torno de 150 kDa e se agregam para formar trímeros de subunidades com massas moleculares variando entre 45-70 kDa (Fernandes & Xavier-Filho, 1998). Estas proteínas de reserva parecem ser multifuncionais, atuando como uma fonte de aminoácidos durante a germinação da planta e ao mesmo tempo podendo participar dos mecanismos de defesa das sementes, sendo tóxicas a insetos (Macedo *et al.*, 1993; Shutov *et al.*, 1995; Sales *et al.*, 2000).

Para muitas sementes a primeira classe de globulinas degradadas é a das vicilinas (globulinas 7S). Essa mobilização é provavelmente mediada por um diferente complexo de proteinases cisteínicas (CPRs). Já foi anteriormente mostrado que para sementes de *Vicia sativa* L., proteinases cisteínas do tipo papaína são as principais responsáveis pela mobilização de proteínas do tipo globulinas. Proteinases CPRs também foram identificadas em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. como responsáveis pela degradação das proteínas de reserva do tipo globulinas 7S presentes no eixo embrionário e nos cotilédones dessas sementes (Tiedemann *et al.*, 2000). Globulinas 8S de *Vigna radiata* são globulinas de reserva do tipo vicilina que consistem de três isoformas: 8S α , 8S α' e 8S β . Essas isoformas apresentam alto grau de similaridade entre si, em torno de 90 %. Essas globulinas são as principais encontradas em sementes de *V. radiata* (Itoh *et al.*, 2006).

1.5.1 – GLOBULINAS E SUAS FUNÇÕES NA DEFESA DE PLANTAS

Em adição a função como reserva protéica, trabalhos confirmam a idéia da participação das vicilinas como defesa constitutivas de sementes. Trabalhos mostraram que o grau de digestibilidade, por proteinases do intestino médio do inseto *C. maculatus*, de vicilinas dos cultivares de *V. unguiculata* resistentes ao ataque desse inseto, é menor do que o de vicilinas de cultivares susceptíveis (Sales *et al.*, 1992). Ainda, vicilinas variantes de sementes de *V. unguiculata* são consideradas o principal fator de resistência presente nos genótipos africanos IT81D-1045, IT81D-1032 e TVu-2027 contra *C. maculatus* (Macedo *et al.*, 1993).

Estudos mostraram que vicilina de várias sementes de leguminosas apresentaram a propriedade de se associar a matrizes de quitina e a estruturas que contêm quitina no intestino médio de insetos (Sales *et al.*, 1996, Yunes *et al.*, 1998, Mota *et al.*, 2003, Paes *et al.*, 2008). Gomes *et al.* (1997) mostraram que vicilinas de feijão-de-corda e de outras sementes de leguminosas inibem o desenvolvimento de fungos filamentosos, organismos que apresentam quitina em sua parede celular. Proteínas do tegumento de várias sementes que foram tóxicas a *C. maculatus* quando incorporadas em sementes artificiais, apresentaram homologia de seqüência de aminoácidos com vicilinas, como no tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis* (Oliveira *et al.*, 1999), *Phaseolus lunatus* (Moraes *et al.*, 2000) e *Phaseolus vulgaris* (Silva *et al.*, 2004).

Apesar de se conhecer a ação tóxica de vicilinas sobre *C. maculatus*, seu mecanismo de toxicidade ainda não é completamente entendido. Propriedades tóxicas de vicilinas podem também estar relacionadas ao seu reconhecimento e interação com glicoproteínas. Estudos recentes mostraram que essas proteínas apresentam efeito sistêmico, pois foram detectadas em vários órgãos de larvas de *C. maculatus*, tais como na hemolinfa, no corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi (Uchôa *et al.*, 2006).

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL:

Estudar tegumentos de diferentes sementes não-hospedeiras no que tange à sua atuação enquanto barreiras contra o inseto *Callosobruchus maculatus*.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Acompanhar o desenvolvimento de *C. maculatus* em sementes naturais nativas e cultivadas de diferentes espécies de leguminosas;
- Investigar a influência dos tegumentos de sementes não-hospedeiras nativas e cultivadas sobre a infestação por *C. maculatus*;
- Isolar e identificar proteínas do tegumento de *Albizia sp* e avaliar suas toxicidades para *C. maculatus*.

3 – MATERIAIS

3.1 - MATERIAIS BIOLÓGICOS

3.1.1- SEMENTES

- As sementes de *Albizia sp* e *Vigna vexilata* foram obtidas através de coleta no campus da UENF.
- As sementes de *Vigna unguiculata cv. fradinho* (susceptíveis ao gorgulho), de *Glycine max* (soja comercial) e *Phaseolus vulgaris* (cultivares manteiga e vermelho) foram obtidas comercialmente, no Mercado Central, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.
- As diferentes cultivares de *Glycine max* (soja) foram gentilmente cedidas pela UFV (Universidade Federal de Viçosa), Minas Gerais, Brasil.
- As sementes de *Vigna angularis* e *Dioclea altissima* foram obtidas no laboratório de sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

3.1.2- INSETOS

- Os insetos *Callosobruchus maculatus* foram obtidos a partir de colônia mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.1.3 - ANTICORPOS

- Anticorpo anti-vicilina de *Vigna unguiculata cv. EPACE-10* foi produzido em coelho pela Dra. Adriana Ferreira Uchôa e gentilmente cedido para esses experimentos.
- Anticorpo anti-IgG de coelho complexado a peroxidase foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich.

3.2 – PRINCIPAIS REAGENTES

- Sulfato de amônio – Vetec;
- SDS e TEMED - Merck S/A Indústrias Químicas;
- Acrilamida e bisacrilamida - Sigma Co;
- Azocaseína – Sigma Co;
- Papaína – Sigma Co;
- Gelatina – Sigma Co;
- OPD – Sigma Co;

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.3 – PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento – Mod. NT 103, Nova Técnica;
- Balança analítica – Shimadzu AX200;
- Câmera filmadora CCD- Biocam;
- Centrífuga refrigerada – Hitachi;
- Coletor de frações – Pharmacia LKB FRAC-100;
- Espectrofotômetro – Shimadzu UV Mini 1240;
- Estufa incubadora do tipo BIOD- Fluxo Tecnologia LTDa.;
- Leitor de microplacas – Awareness technology Inc.;
- Liofilizador – Liotop L101;
- Lupa –Tecnival;
- Sistema de Eletroforese – Mini-Protein II Cell, BioRad.;

4 – MÉTODOS

4.1 – CRIAÇÃO DE INSETOS

A colônia de *Callosobruchus maculatus* utilizada neste estudo tem sido mantida em sementes hospedeiras de *Vigna unguiculata* cv. Fradinho, em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechados com tampas plásticas perfuradas. Os frascos são mantidos em câmara de crescimento a temperatura de 28° C e umidade relativa de 65%. A cada geração, infestam-se novas sementes com fêmeas de dois dias após emergência, com o período de postura de 1 dia.

4.2 - INFESTAÇÃO DAS SEMENTES NATURAIS COM *Callosobruchus maculatus* E ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS

Sementes de *Phaseolus vulgaris* (cultivares Manteiga e Vermelho), sementes de *Vigna unguiculata*, *Vigna vexilata*, *Vigna angularis*, *Dioclea altissima*, *Albizia sp* e sete cultivares de *Glycine max* (semente comercial e os cultivares Tucunaré, Elite, Conquista, UFV 20 Florestal, UFUS 2003 e UFUS 2005) foram infestadas com fêmeas de *C. maculatus*. Como controle positivo foi feito o acompanhamento do desenvolvimento larval em sementes de *V. unguiculata* (cv. Fradinho).

As fêmeas com 2 dias de idade permaneceram em contato com as sementes por 48 horas em estufa incubadora a 28° C. Após esse período, o número de ovos postos foi contado. O desenvolvimento larval dentro do ovo foi acompanhado, através de filmagens com uma câmera (CCD) acoplada a lupa, a partir do primeiro dia de postura (primeiro dia de vida da larva) até a completa travessia pelo tegumento ou a morte. Durante esse período as sementes permaneceram na estufa a 28° C. Foi verificado o número de ovos postos, larvas eclodidas, tempo de perfuração do tegumento e, para alguns casos, número de insetos emergidos após 40 dias da oviposição.

4.3 – INFESTAÇÃO DE SEMENTES ARTIFICIAIS RECOBERTAS COM TEGUMENTOS NATURAIS COM *Callosobruchus maculatus*

Sementes artificiais recobertas com tegumentos naturais foram preparadas com farinha de *Vigna unguiculata* (cv Fradinho). 50 mg de farinha foram

colocados na parte inferior de um molde cilíndrico e sobre essa massa foi colocado um pedaço de tegumento (com sua parte externa voltada para baixo) retirado de sementes naturais de *Glycine max* (cultivar comercial e cultivares Tucunaré, Elite, Conquista, UFV 20 Florestal, UFUS 2003 e UFUS 2005) ou *Vigna unguiculata* (controle positivo). Posteriormente, mais 400 mg de farinha foram colocados sobre o tegumento. A semente foi então prensada com o auxílio de uma prensa manual e posteriormente, retirou-se a semente artificial do molde e o excesso de farinha (50 mg) sobre o tegumento foi retirado com o auxílio de um estilete até o aparecimento do pedaço do tegumento natural, ficando a semente com um peso final de 400 mg de farinha (Figura 2). Sementes controle contendo um pedaço do tegumento de *V. unguiculata* foram preparadas da mesma forma. As partes da semente artificial não envolvidas pelo fragmento de tegumento, foram protegidas com parafilme e fêmeas de 2 dias de idade foram colocadas para ovipositar sobre tegumento. Após um período de 24 horas, as sementes foram desinfestadas, o excesso de ovos postos removido com o auxílio de uma agulha fina, deixando-se apenas 3 ovos por semente, todos sobre o tegumento. As sementes foram incubadas a 28 °C em estufa incubadora e, após 20 dias, desfeitas para a retirada das larvas, e pesagem das larvas. O peso e número de larvas foram comparados com larvas de mesma idade que se desenvolveram em sementes controle (preparadas apenas com farinha de *V. unguiculata* contendo um pedaço de tegumento dessa semente). Os experimentos foram feitos em triplicatas.

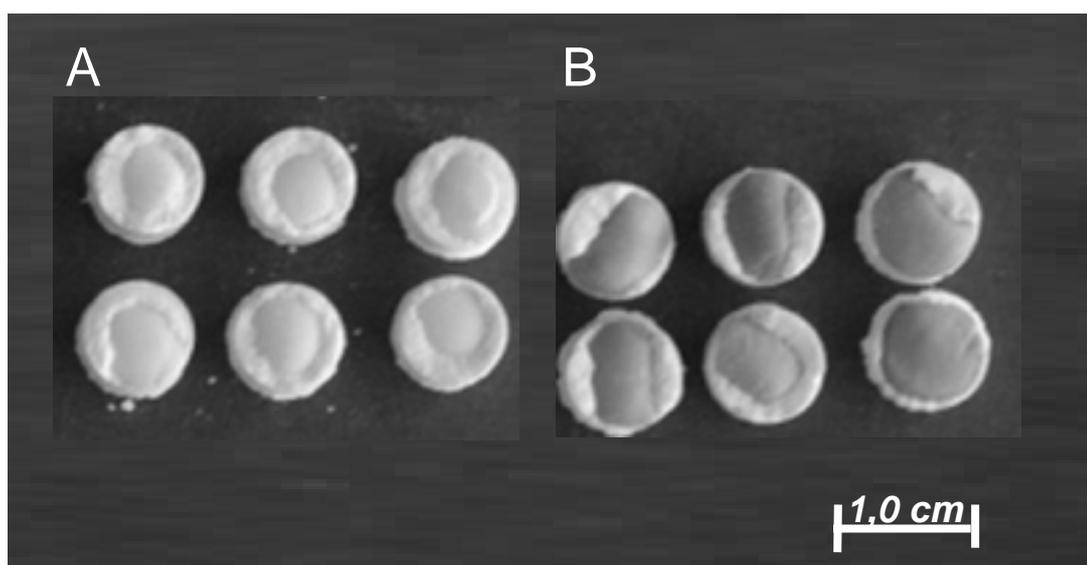


Figura 2 – Modelo de sementes artificiais recobertas com tegumentos naturais. A: Sementes artificiais recobertas com tegumento natural de *C. ensiformis*. B: Sementes artificiais recobertas com tegumento natural de *V. unguiculata*.

4.4 – OBTENÇÃO DA FARINHA E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Albizia sp*

Tegumentos de *Albizia sp* foram separados do embrião, macerados e peneirados em uma peneira de malha fina, para a obtenção da farinha do tegumento. As proteínas da farinha foram extraídas na proporção de 1:10 (m/v), com tampão fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 0,5 M, pH 7,6 (PBS) por 3 horas na geladeira. A suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos, a 4 °C e o sobrenadante obtido foi precipitado com sulfato de amônio de 0 a 90 % de saturação, por 16 horas, a 4 °C. A nova suspensão foi centrifugada a 10.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi dessa vez descartado, sendo o precipitado ressuspensão em água e submetido a diálise contra água durante 72 horas. Após diálise o material foi liofilizado e utilizado para subsequente fracionamento protéico (Figura 3).

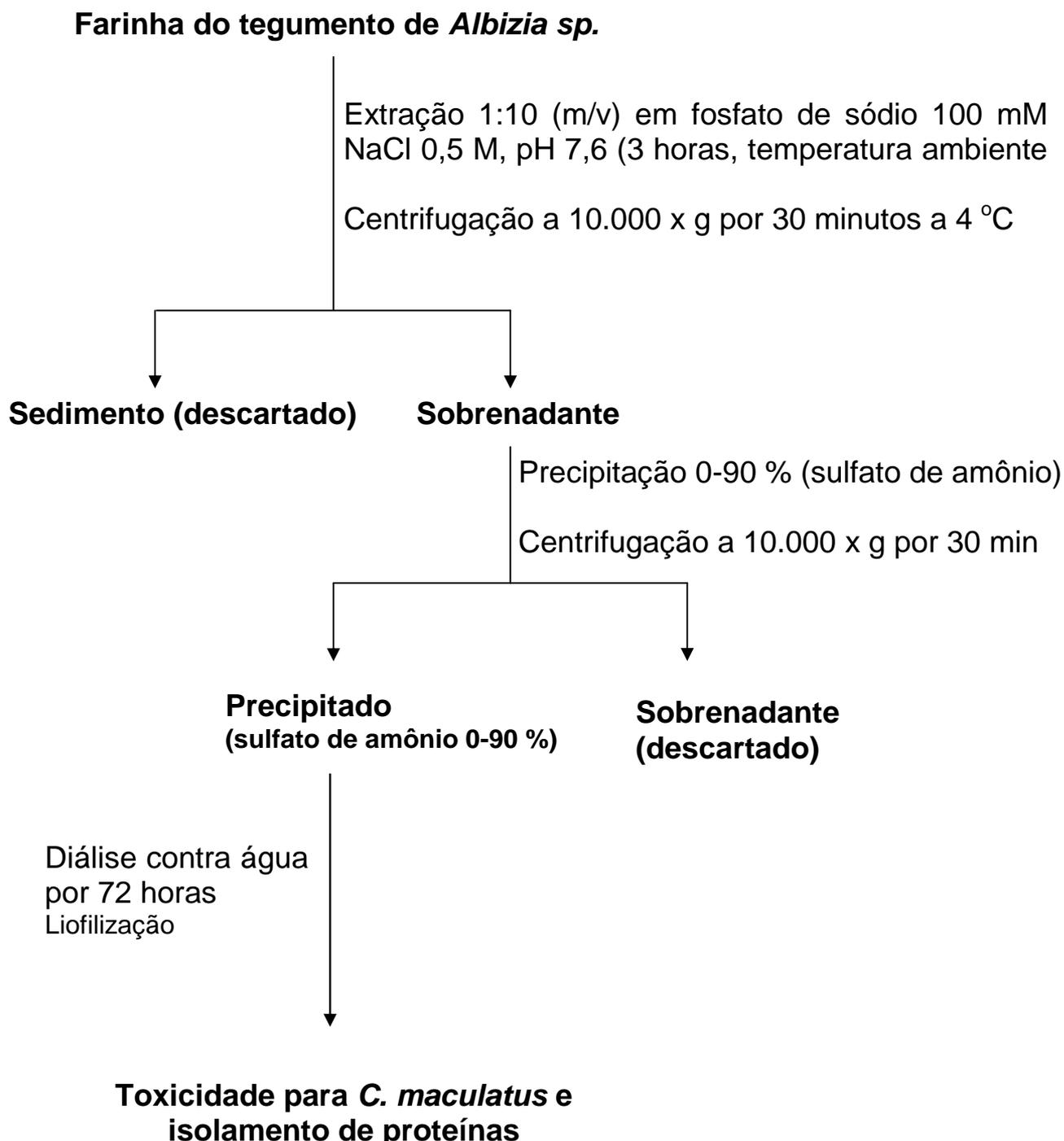


Figura 3 - Esquema de extração de proteínas do tegumento de sementes de *Albizia sp.*

4.5 – ENSAIO BIOLÓGICO PARA AVALIAR A TOXICIDADE DA FARINHA DE *Albizia sp* E FRAÇÕES PARA *Callosobruchus maculatus*

A atividade tóxica das farinhas e frações estudadas para *C. maculatus*, foi testada utilizando-se um sistema de sementes artificiais (Macedo *et al.*, 1993). Sementes artificiais, com massa total de 400 mg, foram preparadas com farinha de *V. unguiculata* contendo concentrações crescentes das farinhas (0, 2, 8 e 16%) ou das frações cromatográficas (0,1; 0,25; 0,5 e 1%). Essas sementes foram infestadas com fêmeas de 2 dias de idade, por um período de 24 horas a 28 °C. Após esse período, as sementes foram desinfestadas, o excesso de ovos postos foi removido com o auxílio de uma agulha fina, deixando-se apenas 3 ovos por semente. Após 20 dias, incubadas a 28 °C, as sementes foram desfeitas para a retirada das larvas, que foram contadas e pesadas. A massa e o número de larvas foram comparados com larvas de mesma idade que se desenvolveram em sementes controle (preparadas apenas com farinha de EPACE-10). Os ensaios foram feitos em triplicata, com um total de 15 sementes por experimento. As massas das larvas e o número de larvas sobreviventes nos experimentos com as farinhas dos tegumentos foram usados para o cálculo dos valores de WD_{50} (concentração que reduz a massa das larvas em 50%) e LD_{50} (concentração que reduz o número de larvas em 50%) respectivamente.

Ainda, experimentos de sementes artificiais foram feitos com sementes contendo 0,1 % da fração CI e 1% de corante blue dextran, para avaliação da permeabilidade da membrana do intestino de larvas quando alimentadas com esta fração. O diferencial foi que não se esperou essas larvas alcançarem a idade de 20 dias, mas já com 16 dias, essas larvas foram dissecadas e analisadas.

4.6 – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Uma amostra de 500 mg da fração precipitada 0-90 % com sulfato de amônia, foi dissolvida em 46 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Esse material foi aplicado em uma coluna de troca iônica em CM-Sepharose (21 x 2,0 cm), equilibrada com o mesmo tampão da dissolução e submetida a um fluxo de 60 mL/hora. O material não retido na resina (CI) foi eluído com o tampão de equilíbrio da coluna e os materiais retidos foram eluídos com NaCl 0,25 M (CII), 0,5 M (CIII) e 1,0 M. Foram coletadas frações de 5,0 mL por tubo e suas

densidades ópticas medidas a 280 nm. As frações obtidas foram dialisadas contra água durante 72 horas e liofilizadas. As frações obtidas foram testadas para sua toxicidade para *C. maculatus* e a fração mais tóxica foi selecionada para o isolamento de proteínas.

4.7 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

A fração CI (obtida na cromatografia de CM-Sepharose) foi fracionada por cromatografia de filtração em gel em resina Sephacryl S-100. Uma amostra de 50 mg da fração foi dissolvida em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.6 e foi aplicada na coluna. O material foi eluído com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.6, num fluxo de 30 mL/hora. Foram coletadas frações de 2 mL e suas densidades ópticas foram medidas a 280 nm. As frações obtidas (denominados SI e SII) foram dialisadas contra água, recuperados por liofilização e a fração SI foi testada quanto a sua toxicidade ao inseto *C. maculatus*.

4.8 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

O perfil protéico das amostras foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, na presença de SDS (Laemmli, 1970). O gel principal foi montado em placas de vidro de 10 x 13,5 cm, misturando-se: 3,3 mL de água destilada; 4,0 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 2,5 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10 %; 100 µL de persulfato de amônio 10 % e 4 µL de TEMED. O gel de empacotamento foi preparado misturando-se: 3,4 mL de água destilada; 830 µL de solução acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 630 µL de tampão Tris 1,0 M pH 6,8; 50 µL de SDS 10 %; 50 µL de persulfato de amônio 10 % e 5 µL de TEMED.

Foram utilizados como marcadores de massa molecular: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,3 kDa).

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 contendo glicerol 10 %, SDS 10 % e azul de bromofenol 1 %). Para algumas análises eletroforéticas padronizaram-se as amostras para a aplicação de 10 µg

de proteínas por poço e para outras foram usadas concentrações semelhantes de tecido (mg de pó).

A corrida eletroforética levou aproximadamente 2 horas em corrente constante de 100 V. O gel foi corado com uma solução de Coomassie Brillante Blue R 0,25 % em metanol, ácido acético e água destilada (5:1:1 v/v/v) durante 16 h e foi descorado por uma solução composta por 35 % de metanol e 10 % de ácido acético, em água.

4.9 – ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE PROTEÍNAS VISUALIZADAS POR SDS-PAGE

Esses experimentos foram realizados na FIOCRUZ em colaboração com o Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e o Dr. Jonas Perales.

Bandas protéicas majoritárias visualizadas por eletroforese nas frações C1 e S1 foram recortadas do gel e lavadas com uma solução 1:1 (v/v) de tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 e acetonitrila por 15 min. Esse procedimento foi repetido inúmeras vezes até completa descoloração das bandas. Posteriormente, o gel foi desidratado pela adição de 200µL de acetonitrila por 5 min e seco por centrifugação a vácuo. As amostras foram reduzidas com 100 µL de DTT 65 mM por 30 min a 56°C e alquiladas com 100µL de iodoacetamida 200mM por 30 min a temperatura ambiente. A solução de iodoacetamida foi removida e as bandas foram lavadas com bicarbonato de amônia 100mM pH 8,0 e o gel desidratado novamente com 200µL de acetonitrila por 5 min (repetido duas vezes). O solvente foi removido e os pedaços de gel foram re-hidratados com 10 µL de uma solução gelada de tripsina (20 ng/µL) em tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 por 45 min, sob refrigeração. Posteriormente 20 µL do tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 foram adicionados e as amostras incubadas por 16h a 37 °C. Após digestão das bandas protéicas os peptídeos foram extraídos pela adição de 15 µL de tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 sob ultrasonicação por 10 min. A solução foi transferida para outro tubo e submetida à redução de volume por centrifugação a vácuo até 10 µL. Tips do tipo C18 ZipTip para micropipetas foram usados para dessalinizar os peptídeos obtidos. Os tips foram ativados com acetonitrila e equilibrados com TFA 0,1% (v/v) em água. A amostra foi aspirada e dispensada por oito ciclos seguidos e

posteriormente o tip foi lavado com TFA 0,1%. Os peptídeos retidos nos tips foram eluídos com 1 µL de acetonitrila 50% em TFA 0,1%. Um volume de 0,3 µL dessa amostra foi depositado sobre a placa de aço do espectrômetro MALDI (ABI 192-target MALDI plate) e a amostra foi co-cristalizada com 0,3 µL de matriz α -ciano-4-ácido-hidroxi-cinâmico (CHCA) a 10mg/mL em solução de acetonitrila 50% e TFA 0,1% (v/v).

O espectro de massas foi adquirido usando o analisador ABI 4700 Proteomics (TOF/TOFTM) (Applied Biosystems, U.S.A.) no modo refletor. Foi usada uma curva de calibração com bradicinina (757.39 Da), angiotensina II (1046.54 Da), P14R (1533.85 Da) e fragmento de ACTH 18–39 (2465.19 Da). A lista de picos monoisotópicos foi gerada usando-se o software (4000 Series Explorer version 3.0 RC1). Filtros foram aplicados para excluir massas inferiores a 900 Da. Picos de massa com sinal de 20 ou acima (noise ratio) foram usados para pesquisa em bancos de dados (NCBI) usando-se o software MASCOT versões 2.1 e 2.2.

4.10 - ENSAIO *in vitro* DE ATIVIDADE DE PROTEINASE CISTEÍNICA DO TIPO PAPAÍNA

As frações CI e SI, bem como as larvas de *C. maculatus* alimentadas com a fração CI, tiveram seus níveis de atividades cisteínicas dosadas.

As larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas com sementes artificiais contendo CI na concentração de 0,1 % e as larvas controle (que se alimentaram de sementes sem CI) foram dissecadas e tiveram seus órgãos internos separados (hemolinfa, corpo gorduroso e intestino íntegro). Os tecidos e órgãos internos foram diluídos em 33 µL de tampão do ensaio (tampão citrato-fosfato: citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, Triton X-100 0,1 %, DTT 1,5 mM, pH 5,6) para cada larva e a extração se deu por 30 min sob agitação na geladeira, e o extrato obtido foi posteriormente submetido a centrifugação a 40° C por 5 min. O precipitado foi descartado e os sobrenadantes foram usados para a determinação da atividade de proteinases cisteínicas baseado na metodologia desenvolvida por Michaud *et al.* (1994). As amostras de intestino ainda foram submetidas a uma segunda extração com detergente, triton 0,1 %, para liberação de proteínas ligadas a esse órgão.

A solução de azocaseína usada no ensaio foi preparada a uma concentração de 1% em tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, Triton X-100 0,1 %, DTT 1,5 mM, pH 5,6) e submetida a aquecimento a 37 °C.

Para o ensaio 30 µL dos sobrenadantes foram adicionados 10 µL de tampão citrato-fosfato e 80 µL de azocazeína. O branco do ensaio continha 40 µL de tampão citrato-fosfato e 80 µL de azocaseína. Todo o material ficou em banho-maria por 1 h a 37 °C e depois deste tempo acrescentaram-se 300 µL de TCA 10%, a fim de parar a reação. O material foi centrifugado a 4000 x g por 5 min e retiraram-se 350 µL de cada sobrenadante, aos quais foram adicionados 350 µL de NaOH 1M. A absorbância foi analisada em comprimento de onda de 440 nm.

Para o cálculo da concentração de proteinase cisteínica do tipo papaína em cada amostra, usou-se papaína pura (Sigma) nas concentrações de 0,5 a 10 µg da proteína, para o estabelecimento de uma curva padrão de valores de absorbância.

4.11 - ATIVIDADE DE PROTEINASES CISTEÍNICAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO GELATINA

O gel principal foi montado em placas de vidro de 10 x 13,5 cm, misturando-se: 2,3 mL de água destilada; 1,0 mL de gelatina (1,0 %); 4,0 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 2,5 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10 %; 100 µL de persulfato de amônio 10 % e 4 µL de TEMED, sendo deixado para polimerização a 4°C por 16h. O gel de empacotamento foi preparado misturando-se: 3,4 mL de água destilada; 830 µL de solução acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 630 µL de tampão Tris 1,0 M pH 6,8; 50 µL de SDS 10 %; 50 µL de persulfato de amônio 10 % e 5 µL de TEMED.

Volumes de 30 µL das amostras de hemolinfa, corpo gorduroso e intestino de larvas de *C. maculatus* alimentadas com CI (0,1 %) e das larvas controle (obtidas de acordo com item 4.10) foram diluídos com 10 µL de tampão de amostra e aplicados no gel.

A eletroforese se processou por aproximadamente 2 horas em corrente constante de 100 V, a 4°C. Após este período o gel foi lavado em água destilada e posteriormente as proteínas foram renaturadas com duas lavagens com Triton X

100 2,5 %, sob agitação (30 minutos cada lavagem). Após lavagem o gel foi incubado com tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, Triton X-100 0,1 %, DTT 1,5 mM, pH 5,6) em banho-maria a 37°C por 16 h. Após esse período o gel foi corado com uma solução de Coomassie Brilhante Blue R 0,25 % em metanol, ácido acético e água destilada (5:1:1 v/v/v) durante 16 h e foi descorado por uma solução composta por 35 % de metanol e 10 % de ácido acético, em água.

4.12 – DISSECAÇÃO DAS LARVAS E EXPERIMENTOS DE PERMEABILIDADE

Para investigar a influência da fração Cl na permeabilidade da membrana intestinal na hemolinfa, corpo gorduroso e no intestino, larvas de 16 dias após oviposição de *C. maculatus* mantidas em sementes artificiais contendo 0,1 % de Cl e 1 % de corante blue dextran e em sementes controle (com farinha de *V. unguiculata*, cultivar EPACE-10 e 1 % de corante blue dextran) foram dissecadas em solução de NaCl 250 mM. As larvas foram lavadas nesta solução salina e em seguida, transferidas para uma lâmina escavada contendo 50 µL da mesma solução, onde foram dissecadas a frio sob lupa estereoscópica. As larvas foram abertas por uma incisão na porção central, para extravasamento da hemolinfa e exposição do intestino e demais órgãos, tomando-se o cuidado para evitar o rompimento do intestino. A hemolinfa dispersa em um volume de 50 µL de solução salina foi coletada com uma pipeta automática e transferida para tubos de microtubos de 1,5 mL (Eppendorf) mantidos em banho de gelo. Em seguida, o corpo gorduroso foi separado e transferido para microtubos de 1,5 mL mantidos em banho de gelo. Da mesma forma, o intestino foi separado e transferido para microtubos de 1,5 mL e mantido em gelo. Os órgãos e tecidos dissecados foram observados e detectados por filmagem em câmera CCD acoplada a lupa.

As larvas dissecadas e usadas nos experimentos de ensaio *in vitro* de atividade de proteinase cisteínica desenvolvidas apenas com Cl, sem corante blue dextran, foram dissecadas conforme descrito acima, com o diferencial que esses tecidos e órgãos após terem sido dissecados tiveram de ser homogeneizados. Essa homogeneização foi feita utilizando-se um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem munido de um pistilo de teflon, em movimentos manuais, mantendo-se o material constantemente em banho de gelo,

por 5 min. Em seguida, os homogeneizados foram utilizados para os experimentos de dosagens.

4.13 – ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO A QUITINA DAS PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES CI E SI

O método utilizado na preparação de quitina foi o descrito por Hackman & Goldberg (1964). A 50 mg de quitina (Sigma) foram adicionados 1000 mL de HCl 0,1N. A mistura foi deixada em contato por 24 horas com agitações ocasionais, sendo posteriormente centrifugada a 7.500 x g por 20 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 500 mL de NaOH 1N e aquecido a 100° C por 16 horas. Esse aquecimento foi repetido mais duas vezes, e ao término a mistura foi submetida à centrifugação a 7.500 x g por 20 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado acidificado com 500 mL de HCl 2,0 N. O material acidificado foi dialisado contra água por 48 h, centrifugado a 7.500 x g por 20 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (quitina) foi usado como matriz para a montagem da coluna de afinidade.

As amostras CI (162 mg/ 2 mL) e SI (18 mg / mL) foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 0,08 M, pH 5,0 e incubadas com 830 mg de quitina (Sigma) por 30 min sob agitação leve. Após incubação a suspensão foi montada em coluna e o material não retido foi lavado exaustivamente com o mesmo tampão de incubação sob um fluxo de 30 mL/h. O material retido foi eluído com solução HCl 0,1 M. Foram coletadas frações de 2 mL e as densidades ópticas destas foram medidas a 280 nm.

4.14 - DOSAGEM DE VICILINA PELO MÉTODO DE ELISA

Volumes de 100 µL das amostras CI (162 mg/ 2 mL) e SI (18 mg / mL) dissolvidas em tampão acetato de sódio 0,08 M, pH 5,0, assim como 100 µL de cada uma das frações obtidas no ensaio de ligação a quitina, foram submetidos a dosagem de vicilinas, pelo método de ELISA.

Após a sensibilização a placa foi deixada por 16 h a 4 °C. Após esse tempo, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-Tween 0,05 % (300 µL/poço) durante 1 hora e posteriormente a cada poço foram adicionados 300 µL de tampão bloqueador (PBS-Tween contendo 1% de gelatina), por 2 horas a temperatura

ambiente. Após o tempo de bloqueio, a placa foi novamente lavada 5 vezes com PBS-Tween e, posteriormente, a cada poço foram adicionados 50 µL do anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* cv. EPACE-10 (diluído 1:2000 em tampão bloqueador) por 2 horas a temperatura ambiente. A placa foi lavada 10 vezes com PBS Tween e em seguida foi incubada com o anticorpo anti-IgG de coelho complexado a peroxidase (diluído 1:2000 em tampão bloqueador), por 1 h a temperatura ambiente. A placa foi lavada com PBS Tween 10 vezes e a revelação para peroxidase foi feita com o uso de uma solução de OPD (10 mg de OPD em 25 mL de tampão ácido pH 5,0 [ácido cítrico 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M]) contendo 10 µL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). Um volume de 50 µL da solução de revelação foi colocado em cada poço e deixado por 15 min. A reação foi parada com 50 µL de ácido sulfúrico 3 M e a leitura foi realizada a 492 nm.

5 - RESULTADOS

5.1- ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DE *C. maculatus* EM SEMENTES NATURAIS, DA POSTURA ATÉ A PENETRAÇÃO DO TEGUMENTO

Com o intuito de compararmos o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* em sementes hospedeiras e não-hospedeiras, foi feito o acompanhamento diário do desenvolvimento das larvas desde o primeiro dia de oviposição até a completa eclosão da larva (saída da larva de dentro do ovo) em sementes de *V. unguiculata* (cv. Fradinho). Como observado na Figura 4, no 2º dia após a oviposição, o ovo ainda está transparente permanecendo com aparência semelhante até o 3º dia (Figura 4A). No 4º dia é observado um aspecto esbranquiçado (Figura 4B) e em alguns ovos já é observada alguma movimentação das larvas. No 5º dia o ovo volta a ficar transparente e já se observa a larva delineada (Figura 4C), aparentemente bem formada com uma região escura na parte superior da larva (região da cabeça). Os movimentos da larva são nitidamente perceptíveis e quando o ovo foi retirado do contato com a semente, foi observado um furo na parte inferior do ovo, próximo a região bucal da larva (Figura 4D) e o início de perfuração no tegumento (dado não mostrado), mostrando que no 5º dia após a oviposição sobre o tegumento de uma semente susceptível, a larva já começa a se preparar para atravessar o tegumento. No 6º dia o ovo está completamente branco (Figura 4E), e é visível a perfuração atravessando o tegumento (Figura 4F) e alcançando os cotilédones (Figura 4G), e a larva se encontra parcialmente dentro dos cotilédones (Figura 4H).

Quando o desenvolvimento larval foi observado em sementes não hospedeiras, vemos um comportamento bastante diferente. Nas sementes de *Phaseolus vulgaris* (cultivar Manteiga) observa-se que no 2º dia após oviposição, o ovo apresenta-se transparente (Figura 5A), permanecendo com esse aspecto até o 3º dia de desenvolvimento (Figura 5B), mudando seu aspecto no 4º e 5º dias (figura 5C e 5D, respectivamente), com coloração esbranquiçada. No 6º dia de desenvolvimento (Figura 5E), já é possível visualizar a larva, que assim permanece até o 7º dia (figuras 5F-5H). Nestes dias de desenvolvimento já é possível ver a larva se movimentando dentro do ovo. Com 10 dias de desenvolvimento, a larva ainda está viva e bem ativa, se movimentando (Figura

5I). N este mesmo dia a larva iniciou a perfuração o tegumento (Figura 5J) sendo que no 11^o dia o furo alcançou o cotilédone das sementes (Figura 5K). Embora a larva tenha conseguido perfurar completamente o tegumento, houve um retardo de cerca de 4 dias quando comparado com as sementes hospedeiras.

Nas sementes de *P. vulgaris* (cultivar Vermelho) foi observado comportamento semelhante ao cv. Manteiga. Nos 2^o, 3^o e 4^o dias (Figuras 6A, 6B e 6C, respectivamente), o ovo apresenta-se transparente, e assim permanece até o 5^o dia (Figura 6D). No 6^o dia (Figuras 6E e F), a larva já está aparentemente bem formada e se movimentando. Nos 10^o e 11^o dias o ovo está branco e a larva viva (Figura 6G-I). Quando retirou-se o ovo de sobre a semente, observamos uma perfuração no tegumento que já tinha alcançado o cotilédone das sementes (Figura 6I).

Na figura 7 pode ser visto o desenvolvimento das larvas em sementes de *Vigna vexillata*. Nos 2^o e 3^o dias o ovo está esbranquiçado (Figura 7A a C). No 5^o dia observa-se movimentação da larva dentro do ovo (Figura 7D) e no 8^o dia a larva ainda estava dentro do ovo (Figura 7E) e assim permaneceu até o 10^o dia, onde após retirarmos o ovo, foi possível ver que a larva já havia perfurado o tegumento e alcançado o cotilédone, estando com metade de seu corpo para dentro da semente (Figura 7F).

Nas sementes de *Vigna angularis*, (Figura 8) também notamos um retardo no desenvolvimento da larva sendo que só observamos penetração do tegumento no 9^o dia após a oviposição (Figura 8G e H).

As sementes de *Albizia sp* foram as que mais interferiram no desenvolvimento neonatal das larvas de *C. maculatus* (Figura 9). Embora o desenvolvimento inicial tenha acompanhado um padrão normal com ovos esbranquiçados no 3^o dia (Figura 9A), somente no 9^o dia pode ser observada a larva formada e início da perfuração do tegumento (Figuras 9C e D respectivamente). No 10^o dia as larvas ainda estavam vivas (Figura 9E), entretanto no 16^o dia as larvas estavam mortas dentro do ovo (Figura 9F) e não houve perfuração completa do tegumento (Figura 9G).

Na figura 10, pode ser observado o desenvolvimento de *C. maculatus* em diferentes cultivares de sementes de soja. Já no primeiro dia após a oviposição observam-se ovos alterados com bolhas no interior (Figura 10A) e com aparente precipitação de conteúdo (Figura 10B). Essas micrografias são de ovos postos

sobre o tegumento da soja comercial, entretanto essas alterações também foram observadas em ovos postos sobre os outros cultivares de soja. Entre 6º e o 8º dias já é possível visualizar a larva desenvolvida (Figura 10D e E). Na Figura 10F temos o 10º dia, onde alguns ovos estão esbranquiçados com aspecto de eclodido (cultivar UFUS 2003). No 12º dia é possível visualizar uma perfuração no tegumento, mostrando que nesse dia de desenvolvimento algumas larvas já estão se preparando para alcançar o cotilédone, em semente de soja UFUS 2005. Também no 12º dia, em sementes do cultivar Elite, é possível ver (figura 13H), a larva penetrando a semente, com metade de seu corpo já no interior da semente. Na semente de soja, cv. Conquista, no 12º dia, foi encontrado um ovo com perfuração na parte superior, indicando uma possível tentativa de fuga da larva, (Figura 10J). Na Figura 10K observa-se uma larva morta dentro do ovo no 14º dia (cultivar UFUS 2005) e na Figura 10L uma larva morta dentro do cotilédone no 14º dia de desenvolvimento (cv. Conquista).

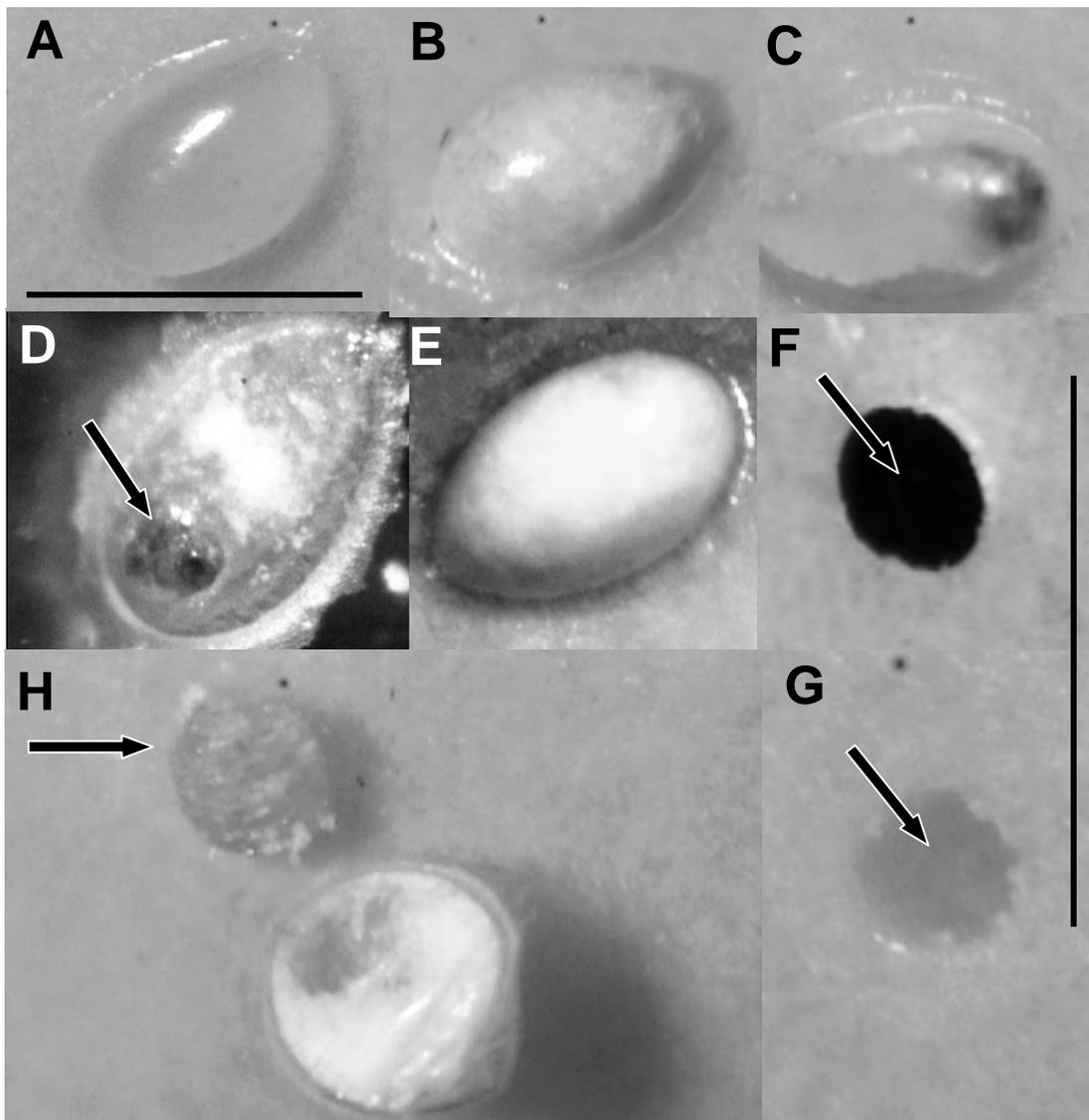


Figura 4 - Desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* em sementes naturais de *Vigna unguiculata*. Em A – 2º dia: Ovo transparente; B – 4º dia: Ovo esbranquiçado e movimentação das larvas; C – 5º dia: Ovo transparente e larva bem delineada, aparentemente bem formada com uma parte escura na região anterior; D - 5º dia: Larva viva e ovo com buraco na parte inferior, próximo a região bucal da larva; E – 6º dia: Ovo completamente esbranquiçado; F – 6º dia: Perfuração atravessou o tegumento; G – 6º dia: Perfuração alcançou o cotilédone; H – 7º dia: Larva parcialmente dentro do cotilédone. Barra de 0,5 mm. A barra de 6A é válida para as figuras 6B, 6C, 6D, 6E, 6H.

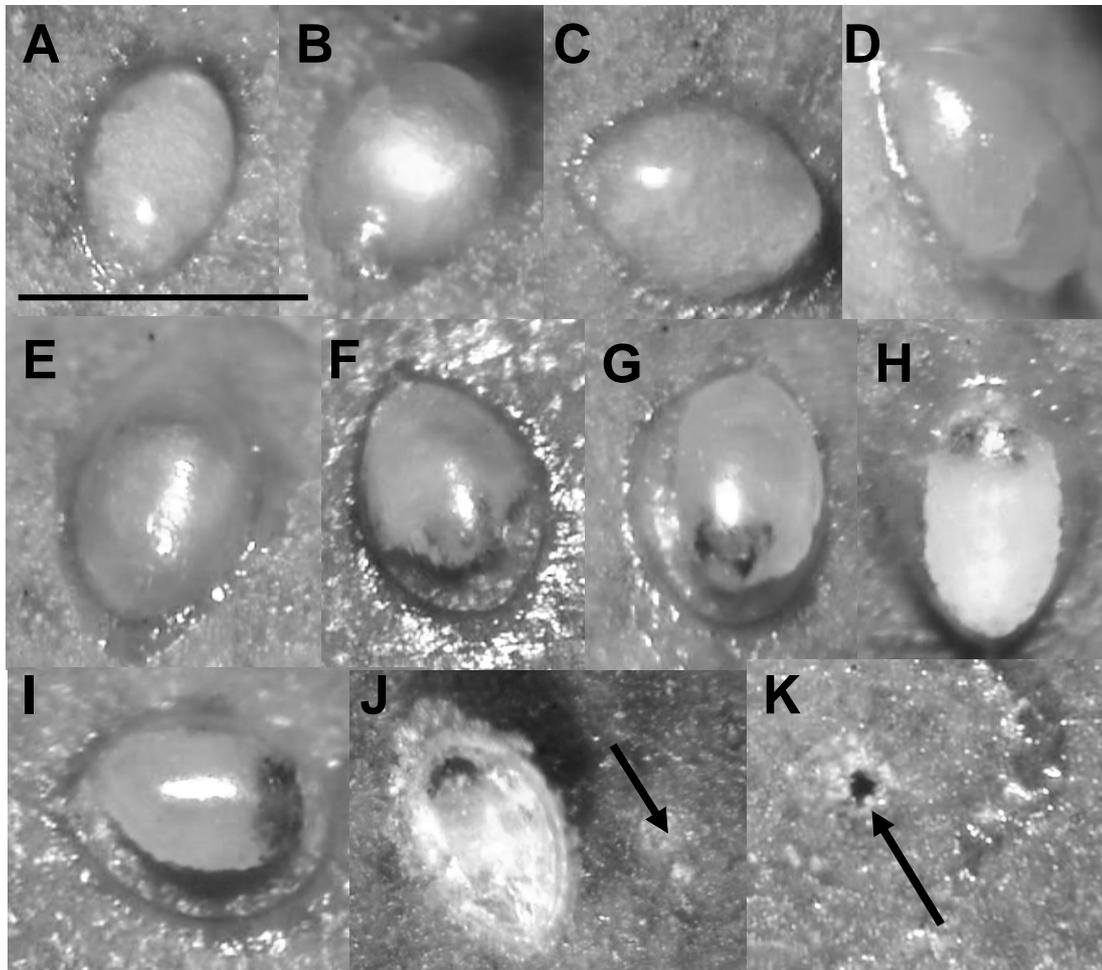


Figura 5 - Desenvolvimento de *C. maculatus* em sementes de *Phaseolus vulgaris* (cultivar manteiga). Em A – 2º dia, B – 3º dia, C – 4º dia e D – 5º dia: Ovo esbranquiçado; Em E – 6º dia Ovo transparente com larva se movimentado; Em F-H – 7º dia: Larva completamente formada se movimentando; I-J – 10º dia: Larva viva e perfuração do tegumento mostrado na seta; K – 11º dia: Perfuração alcançou cotilédone.

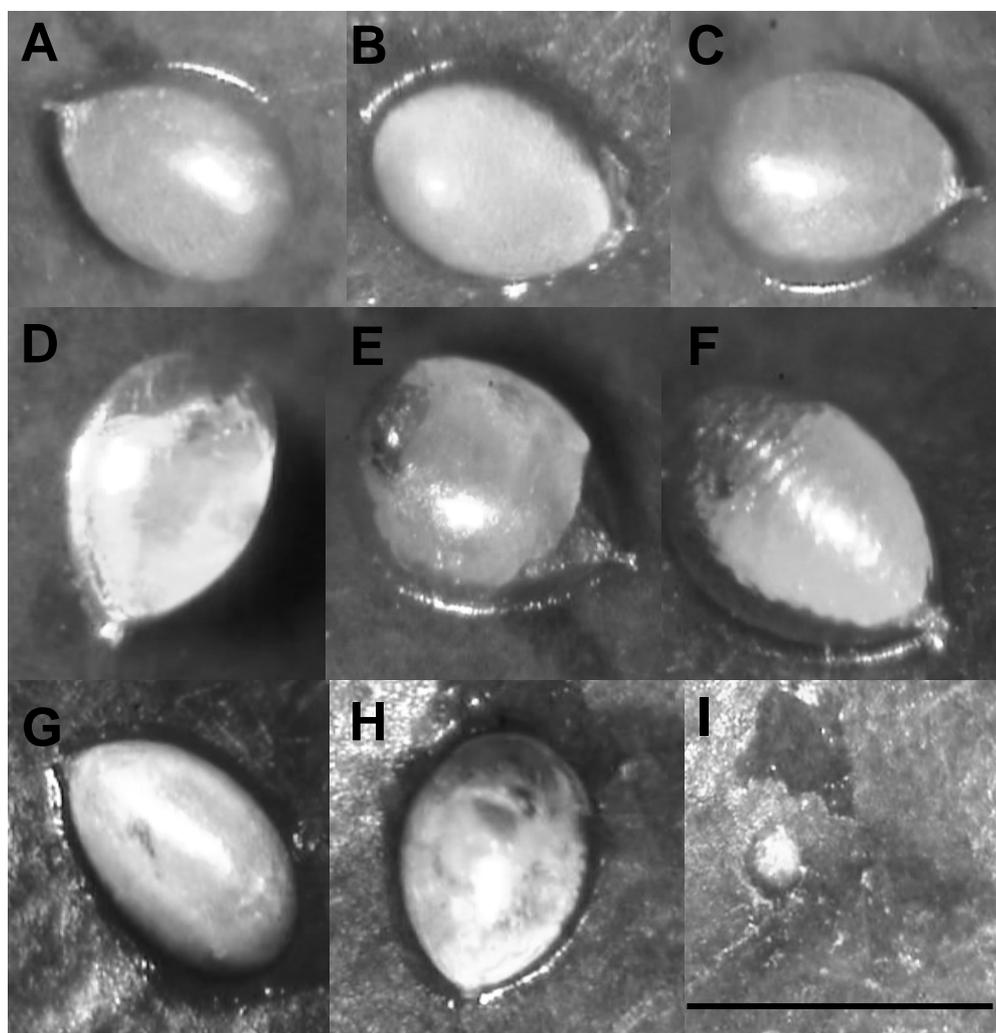


Figura 6 - Desenvolvimento de *C. maculatus* em sementes de *Phaseolus vulgaris* (cultivar vermelho). Em A – 2º dia, B – 3º dia, C – 4º dia: Ovo esbranquiçado; D – 5º dia e E e F – 6º dia: Ovo transparente com larva se movimentado; Em G – 10º dia: Larva viva; H e I – 11º dia: larva viva e perfuração do tegumento e cotilédone como mostrado na seta.

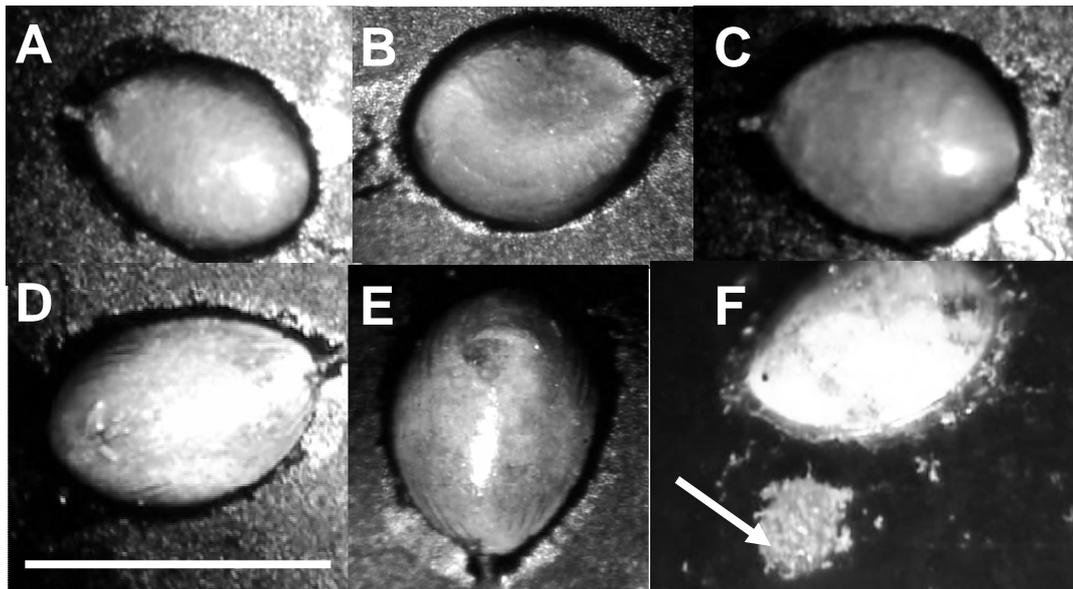


Figura 7- Desenvolvimento de *C. maculatus* em sementes de *Vigna vexillata*. Em A – 2º dia: Ovo esbranquiçado; B e C– 3º dia, ovos esbranquiçados ; Em D – 5º dia: Ovo esbranquiçado com larva se movimentado; E – 8º dia: Larva viva; F – 10º dia: Larva viva e perfuração do tegumento, com larva metade do corpo para dentro da semente.

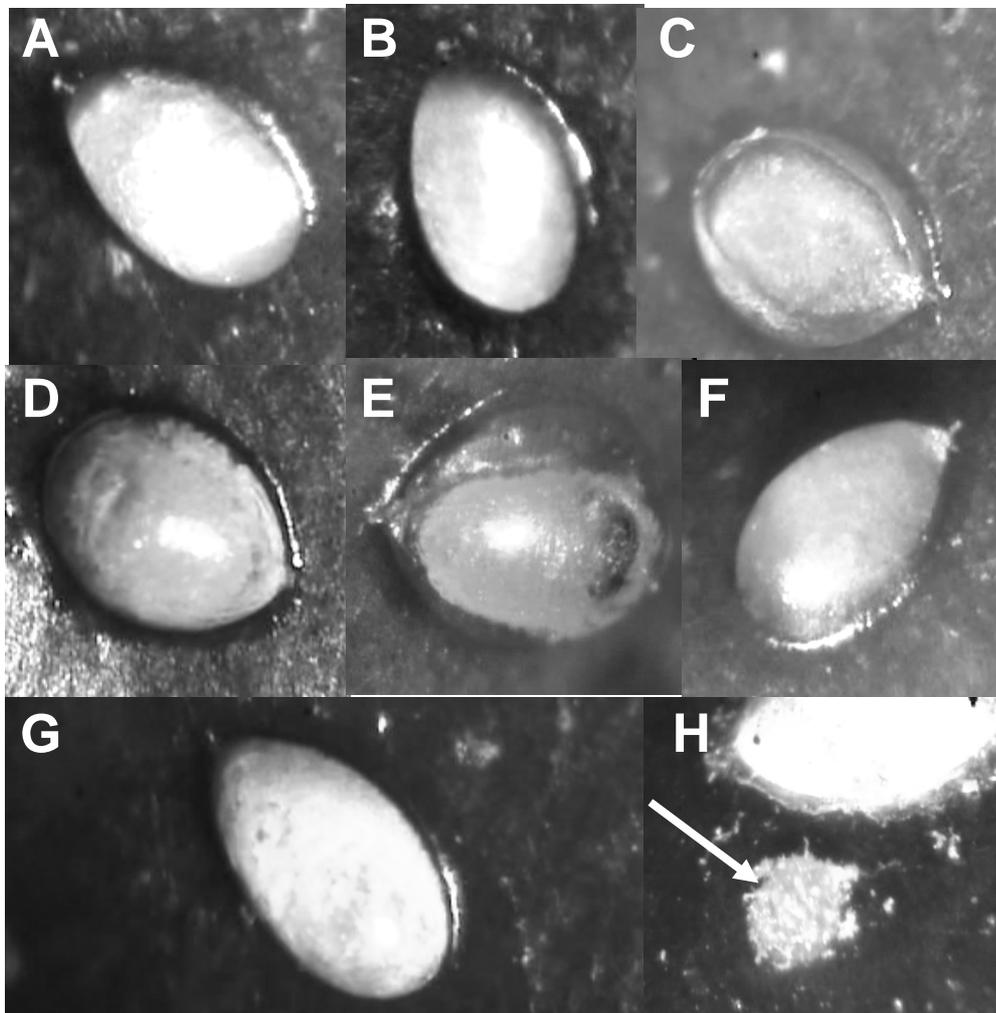


Figura 8 - Desenvolvimento de *C. maculatus* em sementes de *Vigna angularis*. Em A – 2º dia e B – 3º dia: Ovo esbranquiçado; C – 4º dia: Ovo com conteúdo aparentemente particulado; D – 6º dia: Ovo com larva se movimentando. Em E e F – 7º dia: Ovo transparente com larva bem delineada e ovo esbranquiçado com larva se movimentado, respectivamente; G e H – 9º dia: Ovo esbranquiçado com larva viva e após retirada da larva sobre o tegumento observação da larva perfurando o mesmo e penetrando o cotilédone da semente.

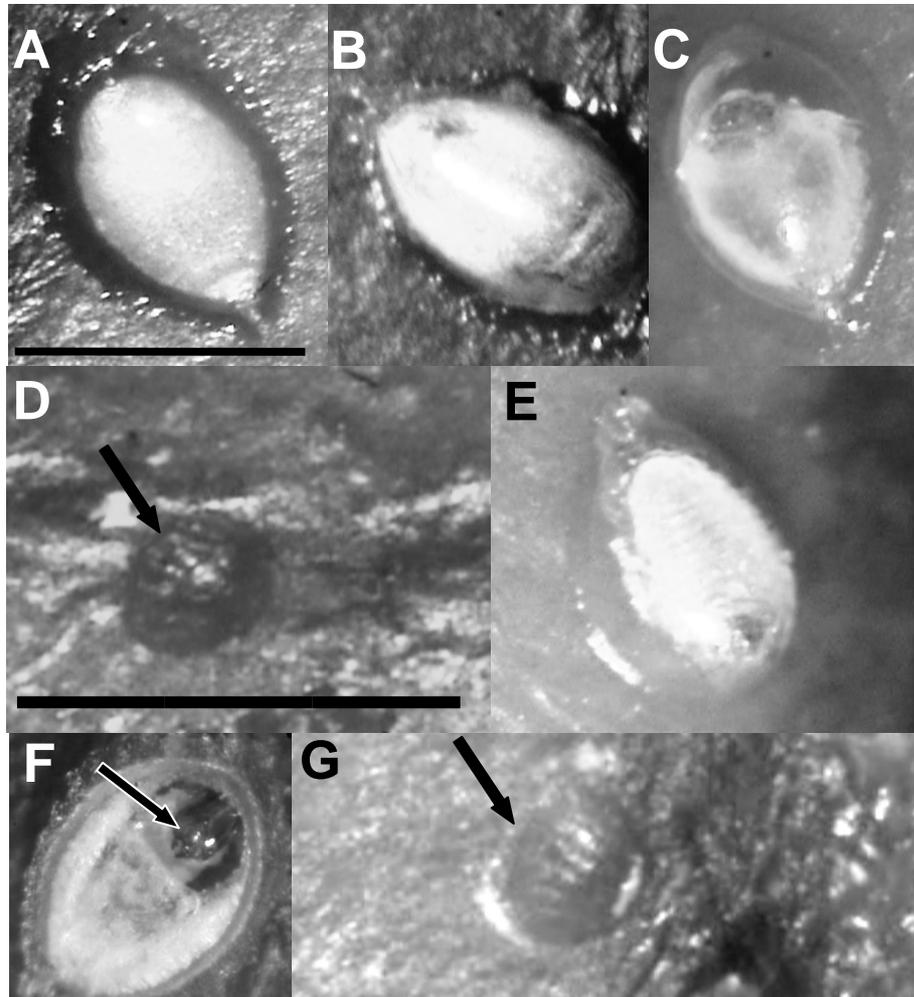


Figura 9 - Desenvolvimento de *C. maculatus* em sementes naturais de *Albizia sp.* Em A – 3º dia: Ovos esbranquiçados; B – 7º dia: Larva bem formada e viva; C – 9º dia: Larva bem formada e ainda viva; D – 9º dia: Início de perfuração no tegumento pela larva; E – 10º dia: Larva viva; F – 16º dia: Parte inferior do ovo mostrando a larva morta dentro do ovo; G – 16º dia: Início de perfuração do tegumento pela larva. Barra de 0,5 mm. A barra da figura 7A é válida para as figuras 7B, 7C, 7E e 7F. A barra da figura 7D é válida para a figura 7G.

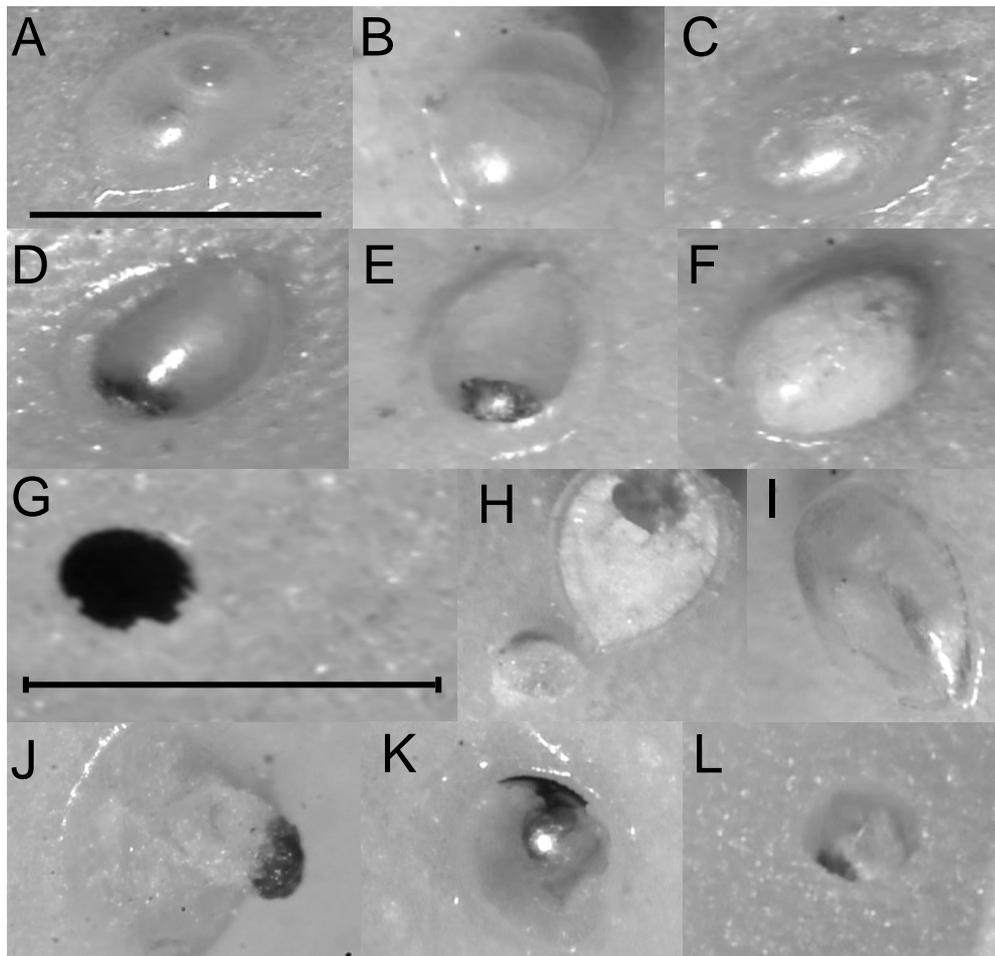


Figura 10 - Desenvolvimento de *C. maculatus* em sementes naturais de soja, do 1º dia após oviposição até o 14º dia de desenvolvimento. A: Ovo com 1 dias (Semente comercial) ; B: Ovo com 2 dias (Comercial); C: Ovo com 4 dias (Comercial); D: Ovo com 6 dias (Comercial); E: Ovo com 8 dias (Comercial); F: Ovo com 10 dias (cultivar UFUS 2003); G:, Perfuração no tegumento de semente cultivar UFUS 2005 (12º dia); H:, Larva penetrando semente de soja cultivar elite (12º dia); I: Ovo perfurado no 12º dia (cultivar Conquista); J: Larva no 12º dia (cultivar Elite). K: Larva morta no 14º dia (cultivar UFUS 2005); L: Larva morta dentro do cotilédone no 14º dia de desenvolvimento (cultivar Conquista). Barras = 0.5 mm. A barra da figura A é a mesma para as figuras B-F e H-L.

5.2 – PERFORMANCE DE *C. maculatus* INFESTANDO SEMENTES NATURAIS NÃO HOSPEDEIRAS

Na figura 11A, temos o perfil de influência de sementes naturais sobre a oviposição, eclosão de larvas, número de larvas que atravessaram o tegumento, emergência de insetos adultos após 40 dias e ainda o tempo que as larvas sobreviventes levaram para atravessar o tegumento. Nossos resultados mostraram que todas as sementes testadas influenciaram negativamente algum parâmetro analisado, comparando-se ao que é observado no controle (sementes hospedeiras *V. unguiculata* cv. fradinho).

As menores taxas de oviposição foram observadas para *P. vulgaris* cv. Vermelho, *V. vexillata*, *Albizia* sp, e para o cultivar Tucunaré da soja não foi observada oviposição. Nessas sementes em decorrência da baixa oviposição todos os outros parâmetros ficaram comprometidos.

Nas sementes de *Phaseolus vulgaris* (cv. Manteiga), mais da metade dos ovos postos eclodiram, entretanto poucas larvas atravessaram o tegumento e conseqüentemente, houve redução no número de larvas que emergiram após 40 dias.

Com as sementes de *Vigna angularis* também houve redução em todos os parâmetros avaliados, quando comparados ao controle. Em sementes de *Dioclea altíssima*, apesar de ter tido um número de ovos de 83, não houve eclosão e conseqüentemente nenhuma larva emergiu após 40 dias.

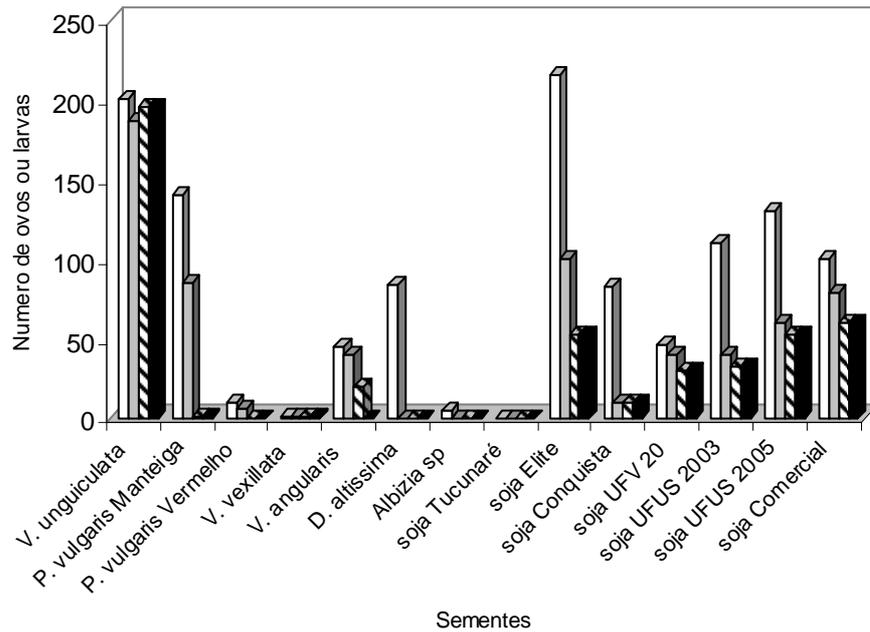
Quando observado o desenvolvimento do bruquídeo em sementes de diferentes cultivares de soja, é possível ver uma variabilidade enorme de cultivar para cultivar, nos parâmetros estudados. Entretanto, em todos os cultivares houve uma redução significativa na eclosão larval, no número de insetos que tiveram sucesso na penetração do tegumento e conseqüentemente na emergência de adultos após 40 dias. No cultivar de soja Elite verificou-se uma alta oviposição, porém houve uma redução na eclosão, penetração e na emergência de adultos maior que 50 %. As outras cultivares, como UFV-20 florestal, UFUS 2003 e UFUS 2005, reduziram a oviposição das fêmeas, e apesar da maioria das larvas terem eclodido após 12 dias, nem todas conseguiram atingir a fase adulta.

Esses dados mostram que as diferentes sementes apresentam graus de susceptibilidade/resistência variados ao bruquídeo *C. maculatus*, independente de seus parentescos ou classificação em sementes silvestres ou cultivadas.

Nas sementes onde foram observadas perfuração completa do tegumento, o tempo que as larvas sobreviventes levaram para alcançar o cotilédone foi anotado (Figura 11B). Nossos resultados mostram que na semente hospedeira de *V. unguiculata*, no 6º dia após a oviposição, a larva já atravessou o tegumento. Em todas as outras sementes estudadas houve um retardo nesse tempo, variando entre 9 e 20 dias, sendo que os maiores valores foram observados para as sementes de soja dos cultivares UFUS 2003 e 2005 com 19 e 20 dias, respectivamente (Figura 11B).

Esses resultados indicam que o tegumento dessas sementes tem uma participação efetiva na resistência contra a penetração das larvas dos insetos.

A



□ oviposição ■ eclosão ■ larva que atravessou o tegumento ■ inseto ou larva após 40 dias

B

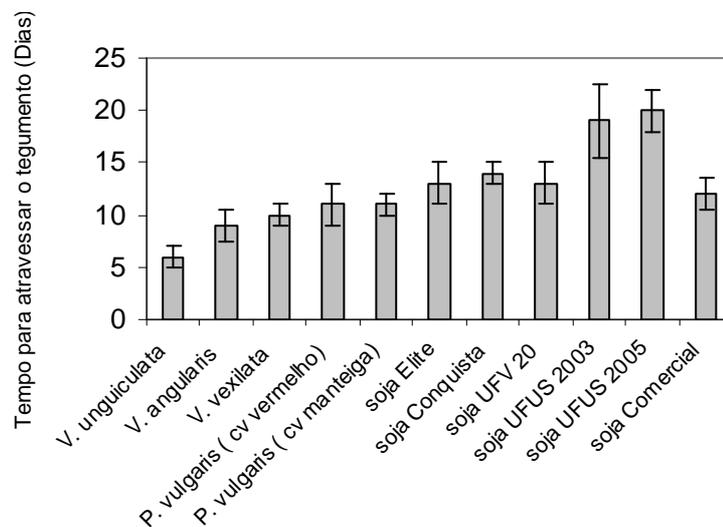


Figura 11 – Em A: Desenvolvimento e sobrevivência de *C. maculatus* em sementes naturais de *Vigna unguiculata* (controle positivo) e em sementes não-hospedeiras de diferentes espécies e cultivares de sementes de soja (*Glycine max*): Tucunare, Elite, Conquista, UFV-20 florestal, UFUS 2003, UFUS 2005 e semente comercial. Em B: Tempo estimado (dias) para a larva sobrevivente perfurar completamente o tegumento. Resultados foram obtidos através da infestação de 60 sementes de cada espécie com 10 fêmeas de *C. maculatus*

5.3 – INFESTAÇÃO DE SEMENTES ARTIFICIAIS RECOBERTAS COM TEGUMENTO DE SEMENTES DE SOJA (*Glycine max*) COM *Callosobruchus maculatus*

Para avaliação da interferência específica dos tegumentos sobre desenvolvimento larval, foram delineados e executados experimentos com sementes artificiais recobertas por tegumentos naturais das diferentes cultivares de soja. Os resultados mostraram (Figura 12) uma alta variação nos seguintes parâmetros analisados: oviposição, ovos eclodidos, número de larvas que atravessaram o tegumento e larvas mortas dentro do ovo. Na semente hospedeira, a oviposição foi alta e praticamente todos os ovos eclodiram e atravessaram o tegumento, não tendo sido encontrada nenhuma larva morta dentro do ovo. Na semente de soja comercial, houve uma pequena redução na oviposição e no número de larvas que atravessaram o tegumento. Das larvas que não atravessaram o tegumento algumas foram encontradas mortas dentro do ovo. As cultivares de soja Elite, Tucunaré e UFUS 2003, apresentaram o mesmo perfil entre elas, tendo apenas um ovo posto, que eclodiu e atravessou o tegumento. Os outros cultivares como conquista, UFV 20 florestal e UFUS 2005, também tiveram a oviposição bastante reduzida se comparada ao controle, e conseqüentemente o número de ovos eclodidos e larvas que atravessaram o tegumento também foram baixos. Nos cultivares UFV 20 florestal e UFUS 2005, metade das larvas foram encontradas mortas dentro do ovo (Figura 12A).

A massa das larvas sobreviventes, que tiveram sucesso ao atravessar o tegumento, foi analisada e os resultados são mostrados na figura 12B. Todas as larvas que atravessaram os tegumentos das sementes de soja tiveram peso médio inferior ao das larvas controle (que atravessaram o tegumento de *Vigna unguiculata*). Enquanto nas sementes controle, a massa larval média foi de 14,3 mg, nos cultivares de soja a larva que esteve mais próxima desta média foi a que atravessou o tegumento do cultivar UFUS 2005, com uma média de 12,8 mg. Para os demais cultivares de soja a redução foi ainda mais acentuada, 3.34, 2.45, 1.44, 5.5 e 12.8 mg respectivamente para as larvas que atravessaram os tegumentos da soja comercial, Conquista, tucunaré, UFV 20 e UFUS 2003 (Figura 12B).

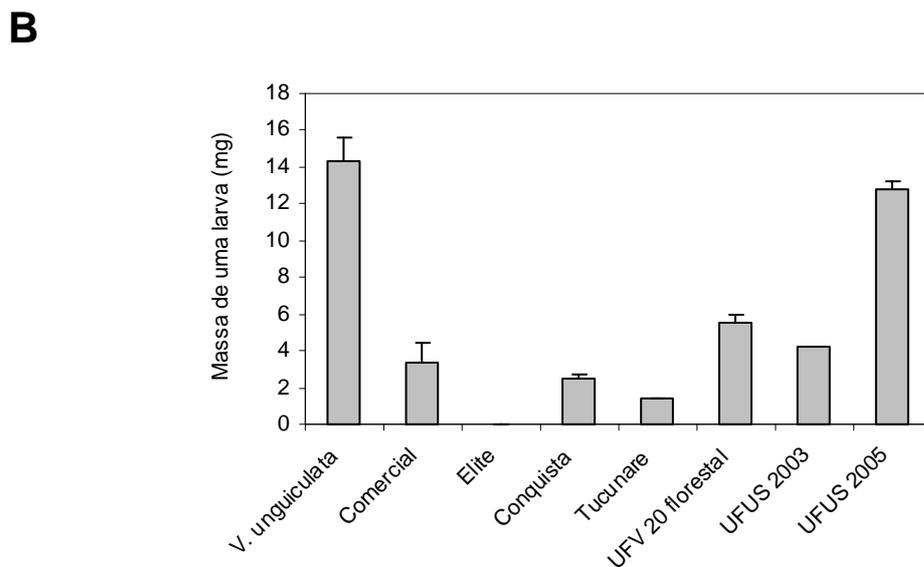
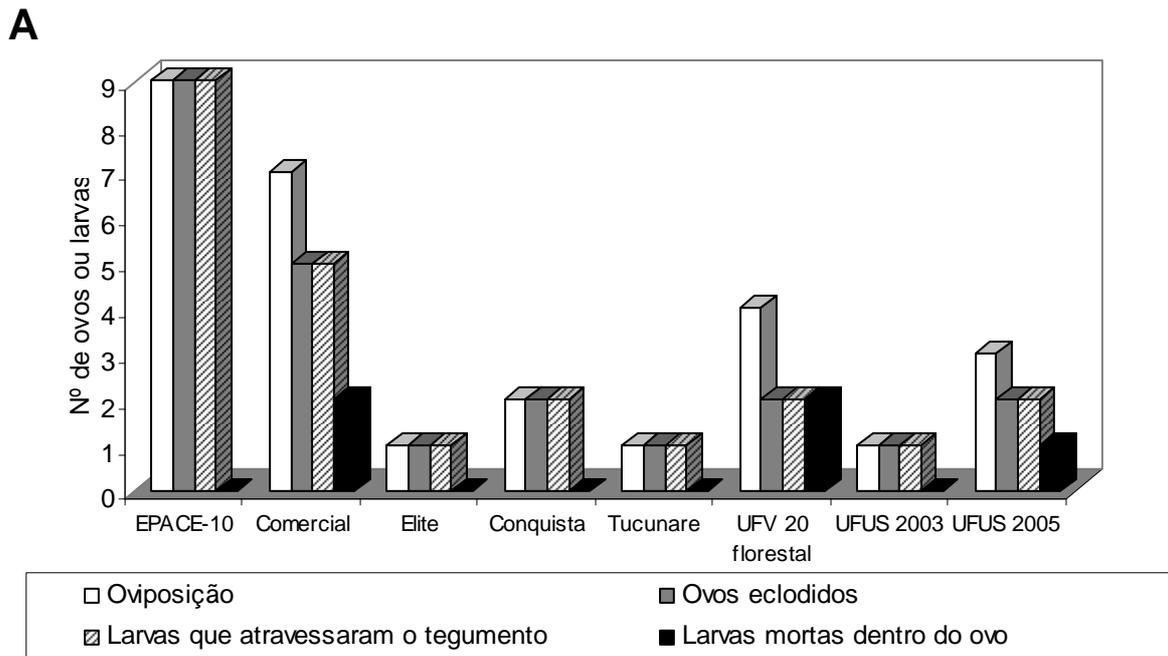


Figura 12 – Desenvolvimento e sobrevivência de larvas de *C. maculatus* em sementes artificiais recobertas por tegumento de sementes naturais de *Vigna unguiculata* (semente controle) e de cultivares de soja comercial, Elite, Conquista, Tucunare, UFV florestal, UFUS 2003 e UFUS 2005. A: Quantificação dos parâmetros oviposição, eclosão, nº de larvas que atravessaram o tegumento e larvas mortas no ovo. B: Média da massa de larvas de *C. maculatus* sobreviventes. Experimentos foram feitos em triplicata e os dados representam uma média desses resultados. Barra = 1 cm.

5.4 – TOXICIDADE DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Albizia sp* PARA *C. maculatus*

Das sementes estudadas, todas mostraram tegumentos com algum grau de interferência sobre o desenvolvimento larval do inseto. Dentre estas, as sementes de *Albizia sp* se destacaram, pois nenhuma larva conseguiu atravessar seus tegumentos, embora tenham mostrado sinais de início de escavação do mesmo (Figura 9G). Desta forma os tegumentos dessa semente foram macerados e a farinha avaliada quanto à sua toxicidade ao inseto. Incorporação da farinha na dieta foi testada em concentração de até 16% e os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo dos índices WD_{50} , LD_{50} e LD. Os resultados obtidos mostram que em concentração de 0,3 % a farinha foi capaz de reduzir em 50 % a massa das larvas (WD_{50}) e na concentração de 1 %, reduz em 50 % o número de larvas sobreviventes (LD_{50}). A dose letal (LD) da farinha de *Albizia sp* foi de 2% (Figura 13).

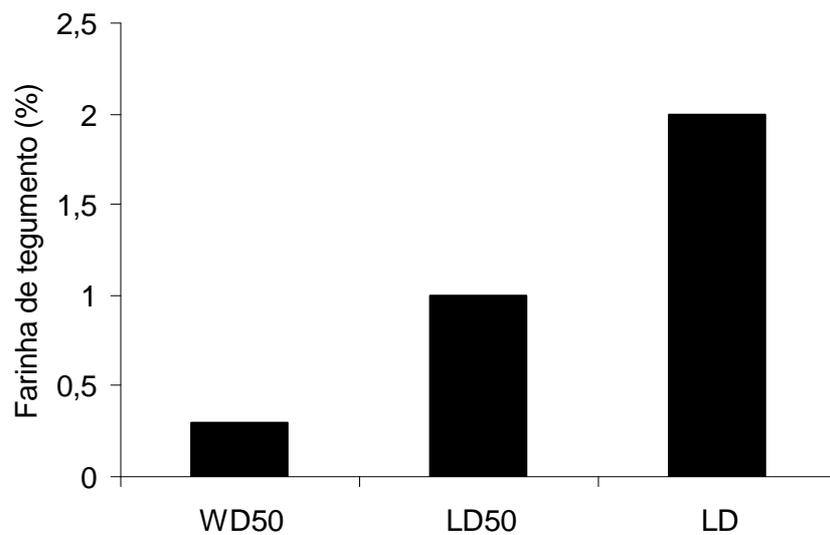


Figura 13 - Toxicidade do tegumento de sementes de *Albizia sp* para *C. maculatus*. Valores de WD50 (Dose que reduz o peso larval em 50%), de LD50 (Dose letal que reduz a 50% o número de larvas) e LD (dose que mata 100% das larvas).

5.5 – FRACIONAMENTO DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Albizia sp* EM COLUNA DE TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE

As proteínas precipitadas com sulfato de amônia do tegumento de *Albizia sp* foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose e dividiram-se em três frações: Uma fração não retida (CI), e outras duas retidas que foram eluídas com NaCl 0,25 M (fração CII) e com NaCl 0,5 M (fração CIII), como mostrado na figura 14.

5.6 – TOXICIDADE DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DA TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE PARA *C. maculatus*

As frações retidas e não retidas foram incorporadas em sementes artificiais em concentrações crescentes (0,1; 0,25; 0,5 e 1%), para avaliação de sua toxicidade às larvas do inseto *C. maculatus*. Aqui o resultado da toxicidade da fração CI (não-retida), que se mostrou a mais tóxica ao inseto, é apresentado. Desde a menor concentração testada, de 0,1 %, a toxicidade já foi alta, tendo sido encontrada apenas uma larva dentro da semente. Nas demais concentrações, nenhuma larva foi encontrada dentro das sementes, como observado através da figura 15A.

Após o período de 20 dias de incubação, os ovos e larvas foram observados em lupa acoplada a filmadora CCD. Nas sementes contendo 0,1% da fração CI, observou-se a presença de larvas mortas. Estas larvas encontravam-se com a cabeça fora do ovo e já se observava furo na semente, indicando que houve consumo da mesma (Figura 15B, painéis A e B). A observação dos ovos postos sobre as sementes contendo 0,5 % e 1,0% mostrou a presença de larvas mortas com metade do corpo já dentro das sementes (Figura 15B painel C).

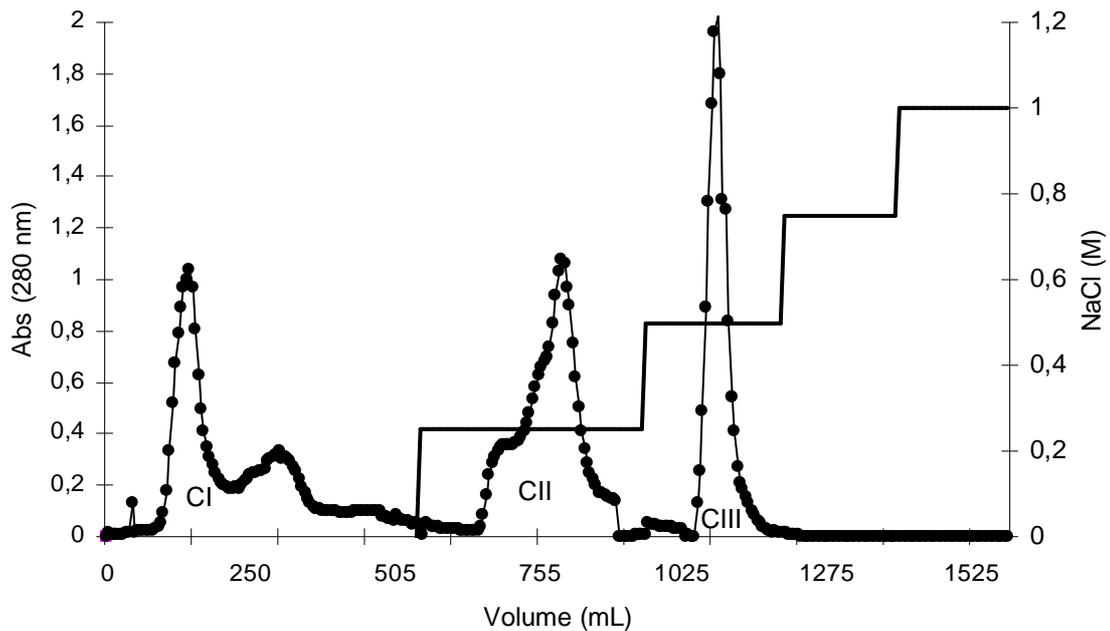
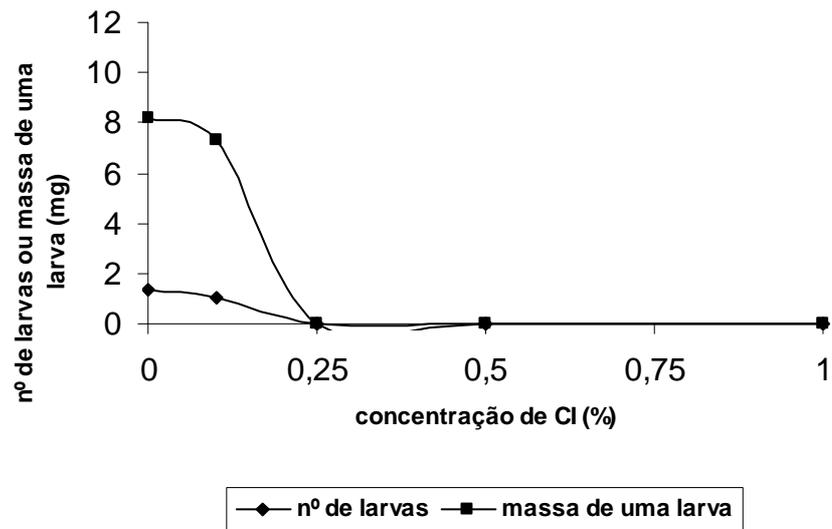


Figura 14 – Cromatografia de troca iônica do precipitado 0-90% em coluna de CM-Sepharose. O material não retido (CI) foi eluído com o tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e os picos retidos, eluídos com NaCl 0,25 M (CII) e 0,5 M (CIII). Foram coletados 5 ml por tubo, sob o fluxo de 60 mL/h.

A



B

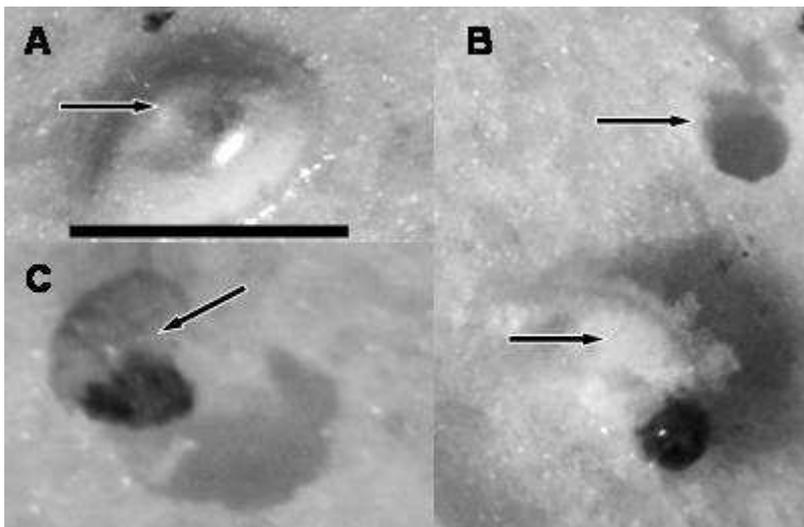


Figura 15 - Efeito da fração CI da cromatografia em CM-Sepharose sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*. Em A: Curva de dose-resposta considerando os parâmetros nº de larvas e massa de larvas alimentadas com a fração. Em B: Visualização dos ovos e larvas que se desenvolveram nas sementes contendo a fração CI após 20 dias. Painel A: Larva que se desenvolveu em semente contendo 0,1 % da fração CI, larva morta dentro do ovo; B: Semente contendo 0,1 % da fração CI - Furo na semente mostrando que a larva se alimentou da semente, larva morta com a cabeça fora do ovo; C': Larvas que se desenvolveram em sementes contendo concentração de 1 % da fração CI – Larvas mortas com metade do corpo para dentro da semente. Barra= 0,5 mm.

5.7 – ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DA FRAÇÃO CI (NÃO-RETIDO) EM SDS-PAGE E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MALDI TOF

A análise do perfil protéico da fração CI em SDS-PAGE revelou a presença de cinco bandas protéicas principais, sendo que dessas cinco apenas, as quatro bandas mais visíveis foram analisadas por espectrometria de massas. Três bandas protéicas com massas moleculares entre 34,7 kDa e 45 kDa, denominadas bandas 1-3 e uma proteína de concentração mais elevada com massa molecular próxima a 18,4 kDa, denominada banda 4 (Figura 16). Essas bandas protéicas foram recortadas do gel, tripsinizadas e os peptídeos resultantes analisados por espectrometria de massas em MALDI TOF e os peptídeos identificados estão listados na tabela 1. Alinhamentos foram considerados satisfatórios quando o íon score foi superior a 40. Os resultados obtidos mostraram a identificação de dois peptídeos provenientes da hidrólise da banda 1. Esses peptídeos foram identificados com 100% de identidade com vicilina de *Vigna unguiculata* (gene ID [emb|CAP19902.1|](#)), proteína de reserva do tipo proteína A (gene ID [gb|AAZ06660.1|](#)) e proteína B de *Vigna luteola* (gene ID [gb|AAZ06661.1|](#)). Não foi possível a identificação de nenhum peptídeo a partir da banda 2. Após hidrólise da banda 3 foi possível a identificação de 8 peptídeos. Dois peptídeos foram identificados como subunidade alfa da globulina 8S de *Vigna radiata* (gene ID [gb|ABW23574.1|](#)), entretanto os íons scores ficaram abaixo de 40. Cinco peptídeos foram idênticos à vicilina de *V. unguiculata* (Gene ID [emb|CAP19902.1|](#)) e um peptídeo foi identificado como uma proteína de reserva do tipo proteína A de *V. luteola* (gene ID [gb|AAZ06660.1|](#)). A partir da banda 4 foram identificados 2 peptídeos, ambos identificados como proteinases cisteínicas (Tabela 1).

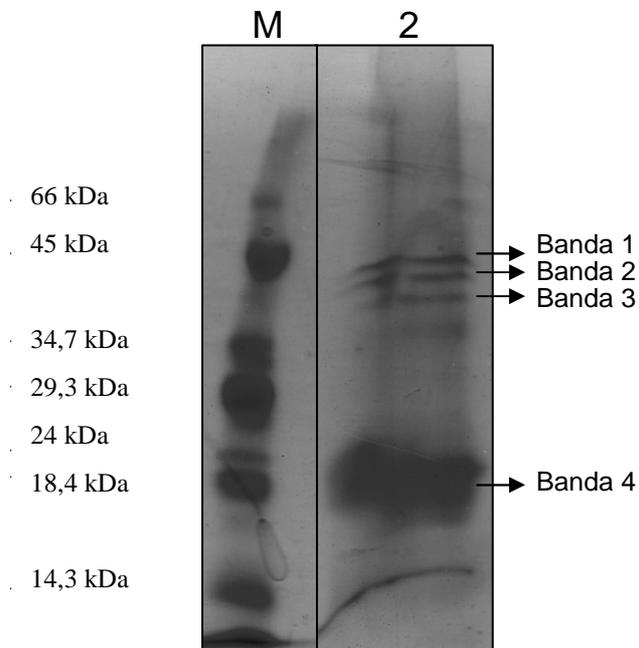


Figura 16- Perfil protéico da fração CI por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. M - marcadores de massa molecular; 2 - Fração CI. As setas indicam as bandas protéicas que foram submetidas à análise por espectrometria de massas. M: Marcadores de massa molecular: 66 kDa: BSA; 45 kDa: Ovalbumina; 34,7 kDa: Tripsina; 29,3 kDa: Anidrase carbônica; 24 kDa: Tripsinogênio; 18,4 kDa: Lactoglobulina; 14,3 kDa: Lizosima.

Tabela 1- Identificação, por espectrometria de massas em MALDI TOF, de peptídeos provenientes da hidrólise triptica de bandas protéicas isoladas do tegumento de sementes de *Albizia sp.*

Spot No.	MS/MS sequencia	Blast score bits	Descrição da Proteína/ ID	Identidade/positividade %
B1	Peptídeo 1 KQIQNLENYRV	40.1	Vicilina [<i>Vigna unguiculata</i>] emb CAP19902.1 	100/100
		40.1	Proteína de reserva proteína A [<i>Vigna luteola</i>] gb AAZ06660.1 	100/100
		40.1	Proteína de reserva proteína B [<i>Vigna luteola</i>] gb AAZ06661.1 	100/100
	Peptídeo 2 RIPAGTTFFLVNPNNDNLRI	71.5	Proteína de reserva proteína A [<i>Vigna luteola</i>] gb AAZ06660.1 	100/100
		71.5	Proteína de reserva proteína B [<i>Vigna luteola</i>] gb AAZ06661.1 	100/100
B3	Peptídeo 1-2 RWFHTLFRN KIPAGTTFFLVNPDDNENLRI	36.3	Subunidade alfa da globulina 8S [<i>Vigna radiata</i>] gb ABW23574.1 	100/100
		36.7		
	Peptídeos 3-7 RAILTLVNPDGRD KQIQNLENYRV RGQNNPFYFSDRW RLHEITPEKNPQLRD REQQQQQEESEWEVQRY	43.9	Vicilina [<i>Vigna unguiculata</i>] emb CAP19902.1 	100/100
		40.1		
62.6				
Peptídeo 8 KLAIPVNNPHRF	42.6	Proteína de reserva protein A [<i>Vigna luteola</i>] gb AAZ06660.1 	100/100	
B4	Peptídeo 1 RNSWGAQWGEKGYIRM	59.2	Proteinase cisteínica papaina-like [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] emb CAQ00103.1 	100/100
	Peptídeo 2 RNSWGANWGEKGYLRV	57.1	Proteinase cisteínica CYP1 [<i>Solanum chacoense</i>] gb AAD56028.1 AF181567_1	100/100

5.8 - ATIVIDADE DE PROTEINASE CISTEÍNICA EM ÓRGÃOS E TECIDOS DE LARVAS DE *Callosobruchus maculatus*

Larvas de 16 dias de idade desenvolvidas em sementes artificiais controle e contendo a fração CI (0,1 %) foram dissecadas e separadas em hemolinfa, corpo gorduroso e intestino e essas partes analisadas para a presença de proteinases cisteínicas através de ensaios *in vitro* e SDS-gelatina-PAGE.

Nossos resultados mostraram a detecção de atividade em todos os órgãos/tecidos testados, em ambas as larvas, alimentadas ou não com a fração CI (Figura 17A). Na hemolinfa e corpo gorduroso, tanto nas larvas controle quanto nas alimentadas com CI foi detectada uma baixa atividade e não houve variação significativa entre o controle e o teste. As maiores atividades de proteinases cisteínicas foram detectadas na fração solúvel do intestino das larvas e também não houve variação entre as larvas. Entretanto, quando os intestinos foram solubilizados com triton para a retirada de moléculas ligadas a esse órgão, foi observada uma enorme atividade para proteinase cisteínica ligada ao intestino de larvas que se alimentaram com a fração CI. Essa atividade aumentou cerca de 7 vezes, de 3,89 para 28 µg de papaína/larva (Figura 17A).

As visualizações dos perfis protéicos e de atividade gelatinolíticas (Figura 17B') das frações dos tecidos das larvas são mostradas, respectivamente, nas Figuras 17B e B'. Algumas bandas protéicas podem ser visualizadas nas frações dos tecidos das larvas e algumas diferenças são observadas entre a hemolinfa controle e tratada (Figura 17B raias H e Ht) e principalmente no corpo gorduroso de larvas controle e tratada (Figura 17B raias CG e CGt). Entretanto a baixa resolução da imagem não favorece conclusões sobre diferenças reais nos perfis de proteínas dessas frações (Figura 17B). Quanto à atividade gelatinolítica, só foi possível visualizar atividade nas frações solúveis dos intestinos de larvas controle e alimentadas com CI, e a maior atividade se concentrava no intestino das larvas controle (Figura 17B' raia I). As frações dos intestinos solubilizadas com triton não apresentaram atividades gelatinolíticas visíveis (Figura 17B' raias I2 e It2).

Esses experimentos necessitam de muitas repetições para que seja possível concluir acerca das diferenças encontradas no resultado mostrado.

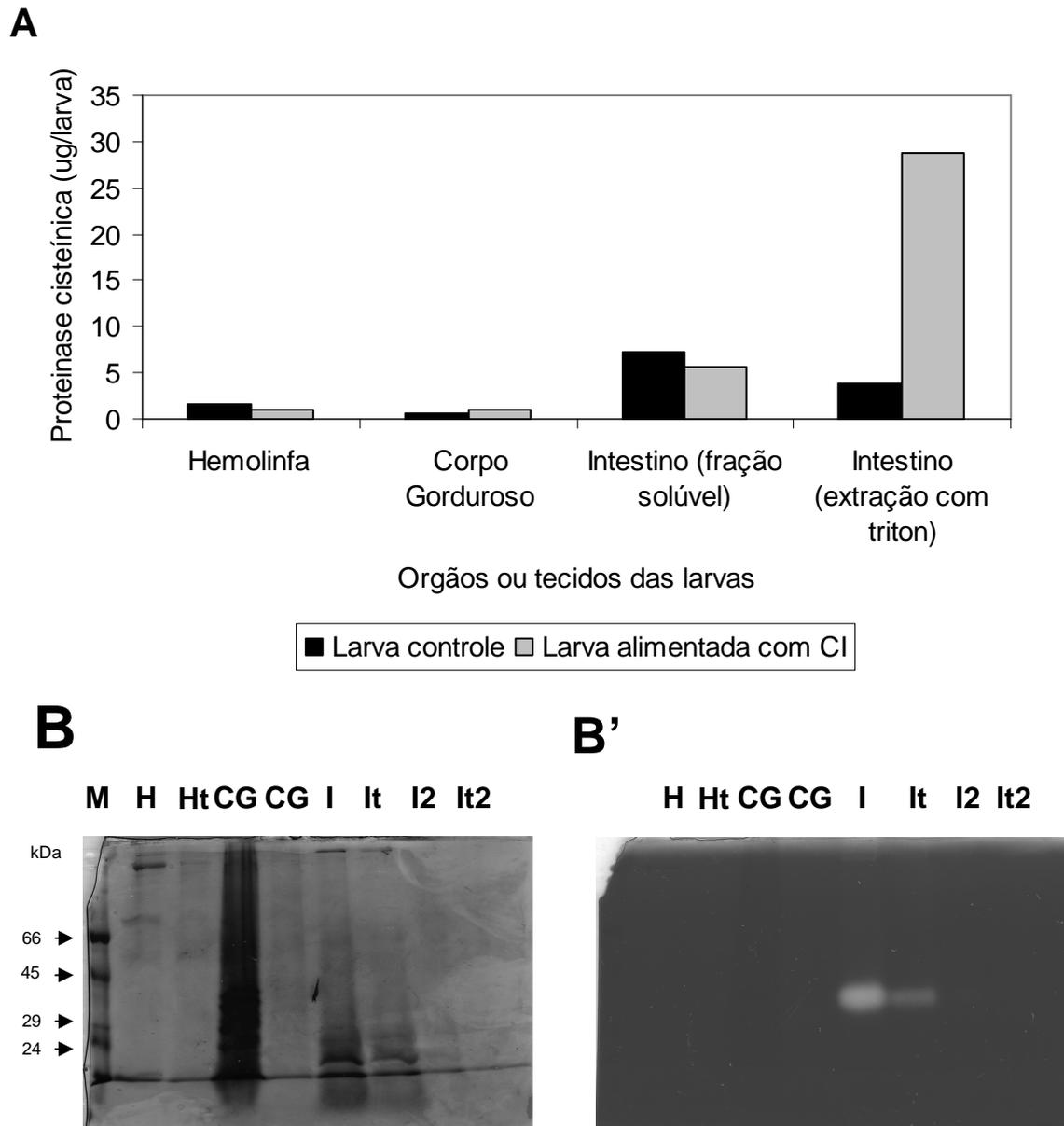


Figura 17 - Atividade de proteinases cisteínicas nos tecidos internos ou órgãos de larvas de 16 dias de *C. maculatus* controle ou alimentadas com a fração CI 0,1%. **A:** Atividade in vitro; **B:** Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e em **B':** Atividade em SDS-gelatina-PAGE de proteinases cisteínicas M: Marcador de massa molecular: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa); H: Hemolinfa da larva controle; Ht: Hemolinfa da larva teste; CG: Corpo Gorduroso da larva controle; CGt: Corpo gorduroso da larva teste; I: Intestino da larva controle; It: Intestino da larva teste; I2: Intestino da larva controle solubilizado com triton; It2: Intestino da larva teste solubilizado com triton.

5.9 – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA INTESTINAL DAS LARVAS DE *C.maculatus* ALIMENTADAS COM A FRAÇÃO CI

Como mostrado anteriormente, larvas alimentadas com CI aparentemente acumulam proteinase cisteínica associada às paredes intestinais. Desta forma para investigar uma possível interferência na permeabilização das paredes intestinais como resultado dessa ligação, larvas foram desenvolvidas em sementes artificiais contendo 0,1 % da fração CI e 1 % de corante blue dextran. Nossos resultados mostraram que após 16 dias de desenvolvimento, o corante blue dextran estava concentrado exclusivamente no intestino das larvas (Figura 18D) não aparecendo na hemolinfa (Figura 18C) nem no corpo gorduroso (Figura 18E). Esses resultados indicam que não houve permeabilidade do intestino ao corante (2.000.000 Da) o que pode sugerir que embora a proteinase cisteínica da fração CI possa estar se ligando a estruturas do intestino, essa ligação não parece estar desestruturando a membrana do mesmo, o que conseqüentemente interferiria na permeabilização. Diferentemente das larvas tratadas com CI, as larvas controle, (crescidas em sementes contendo 1 % de blue dextran) não apresentaram corante no trato digestivo (dados não mostrados). Isso indica que a fração CI pode estar interferindo na digestão, absorção e/ou excreção larval levando ao acúmulo deste corante no intestino das larvas tratadas.

Esse experimento precisa de repetições para que seja possível confirmar o que é visto no resultado mostrado.

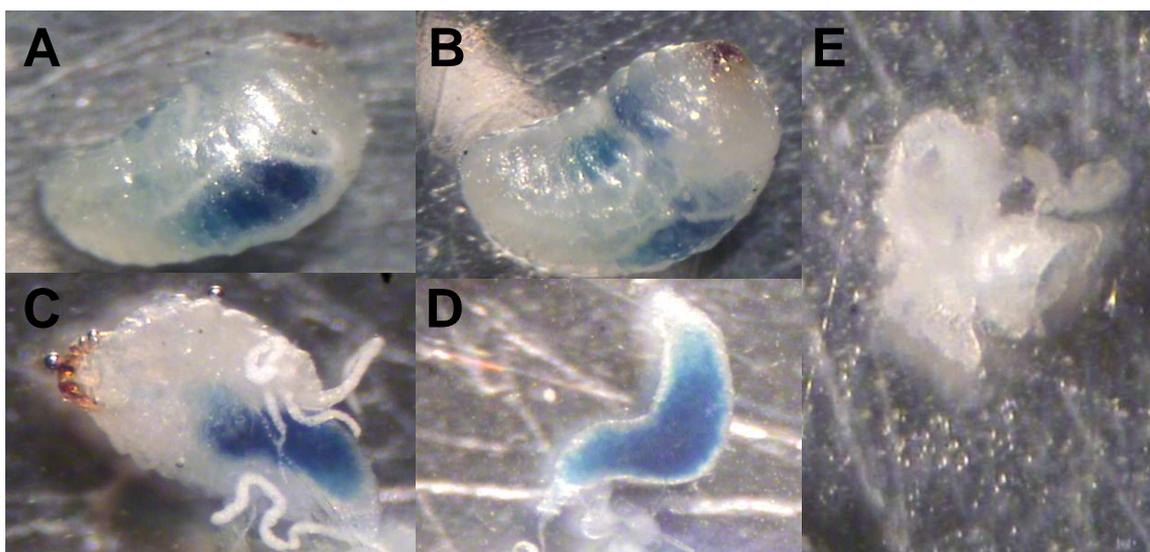


Figura 18 – Larvas de *C. maculatus* com 16 dias, alimentadas em sementes artificiais contendo 0,1 % da fração CI e 1% do corante blue dextran. A e B: Larvas íntegras. C: Larva no início da dissecação do intestino; D: Intestino; E: Corpo gorduroso.

5.10 – ANÁLISE DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO À QUITINA DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CI

O perfil cromatográfico da fração CI em coluna de afinidade a quitina mostrou a presença de proteínas, nessa fração, capazes de interagir com a matriz, indicando uma propriedade de ligação a quitina para essas moléculas. Conforme mostrado na figura 19, o perfil cromatográfico mostrou a presença de dois picos: um não retido na coluna que foi eluído com tampão acetato de sódio 0,08 M, pH 5,0 e outro retido em quitina que foi eluído com solução de HCl 0,1 M (Figura 19).

Visto que proteínas do tipo vicilinas e proteinase cisteínica foram previamente detectadas na fração CI a presença dessas moléculas nas frações retidas obtidas na coluna de quitina foi analisada. Todas as frações não-retidas e retidas na coluna de quitina apresentaram atividade de proteinase cisteínica. Resultados semelhantes foram observados para vicilinas (Figura 19). Esses resultados indicam que ambas vicilinas e proteinase cisteínica apresentam capacidade de ligação à quitina, entretanto a detecção dessas proteínas nas frações não retidas pode indicar ou uma possível saturação da coluna ou ainda que algumas isoformas presentes na fração CI não se liguem à quitina.

Esse experimento necessita de muitas repetições para que seja possível confirmar que a fração CI tenha a capacidade de ligar-se a quitina.

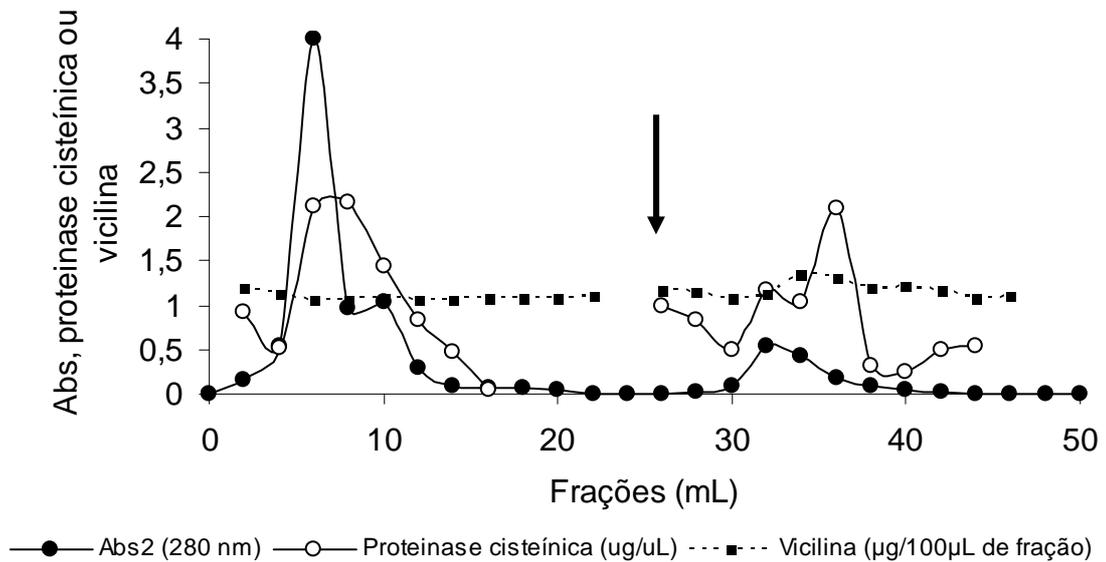


Figura 19 – Cromatografia da fração CI por coluna de quitina e detecção de proteínase cisteínica e vicilinas nas frações não retidas e retidas. O material não retido foi eluído com o tampão acetato de sódio 0,08 M, pH 5,0 e o retido com HCL 0,1 M. Foram coletadas frações de 2 mL sob um fluxo de 30 mL/h. A seta indica o início da eluição com HCL.

5.11 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO CI EM EXCLUSÃO MOLECULAR

O perfil da cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-100 da fração CI mostrou a presença de 3 picos principais eluídos com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,6, conforme mostrado na figura 20. Esses picos foram nomeados SI, SII e SIII, sendo que apenas a fração SI foi possível acumular em quantidade suficiente para os testes com os insetos.

5.12 - EFEITO DA FRAÇÃO SI SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE *C.maculatus*

A fração SI foi testada na concentração de 0,1 % quanto a sua toxicidade para *C. maculatus* e como pode ser visto essa fração foi capaz de reduzir tanto o número quanto a massa (mg) das larvas quando comparado ao controle (Figura 21). Enquanto nas sementes controle, as larvas desenvolveram-se atingindo massa corporal de 8,1 mg após 20 dias, nas sementes que continham 0,1 % dessa fração, a massa das larvas foi de 1,8 mg. Nas sementes deste apenas uma larva conseguiu sobreviver após os 20 dias (Figura 21). Esses resultados mostram uma alta toxicidade desta fração para as larvas do bruquídeo *C. maculatus*.

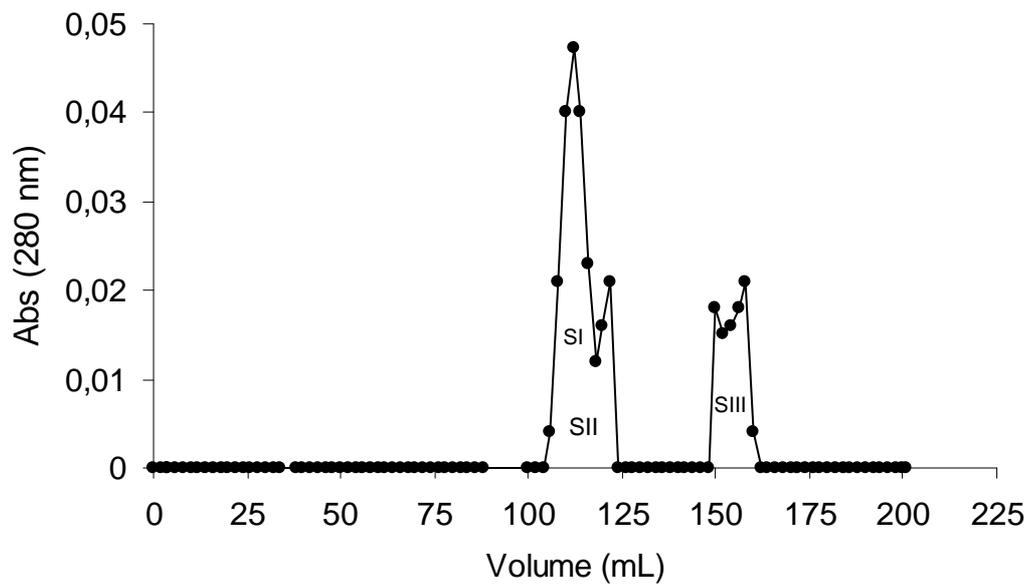


Figura 20 – Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 da fração Cl do tegumento de sementes de *Albizia* sp. A coluna foi equilibrada e as proteínas eluídas com o tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,6. Foram coletadas frações de 2 ml, sob o fluxo de 30 mL/h.

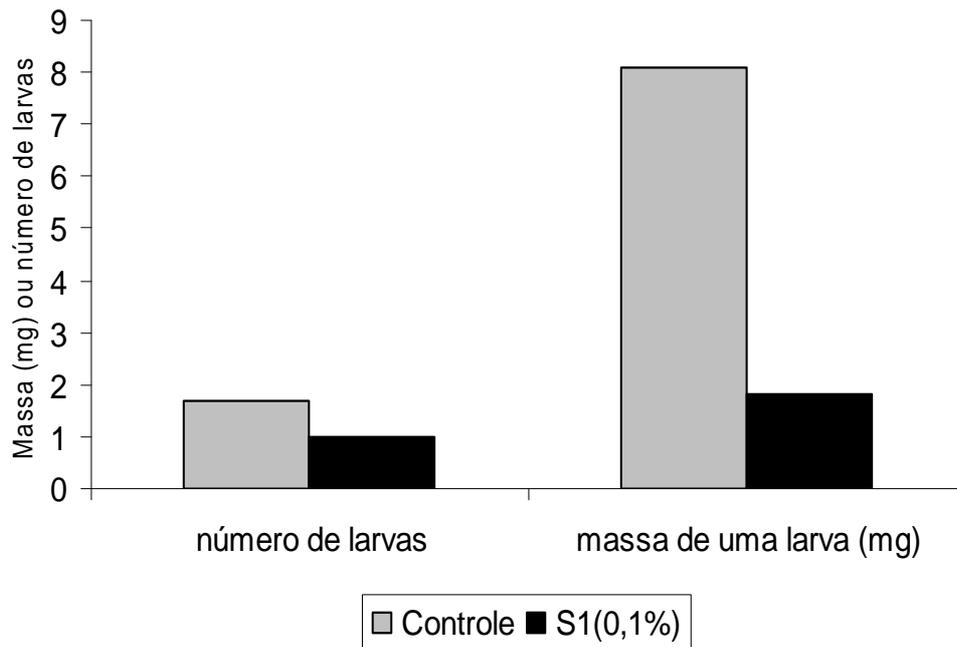


Figura 21 – Efeito da fração SI sobre o desenvolvimento de larvas de *C.maculatus*. As sementes artificiais continham 0,1% da fração e as larvas foram crescidas por 20 dias.

5.13 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO SI POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM MALDI TOF

A análise do perfil protéico da fração SI em SDS-PAGE revelou a presença de 2 bandas protéicas principais próximas a 45 kDa denominadas bandas A1 e A2 (dados não mostrados). Essas bandas protéicas foram recortadas do gel, tripsinizadas e os peptídeos resultantes analisados por espectrometria de massas em MALDI TOF. A tabela 2 mostra os peptídeos identificados a partir dessas proteínas. Alinhamentos foram considerados satisfatórios quando o íon score foi superior a 40. Os resultados obtidos mostraram a identificação de um peptídeo proveniente da hidrólise de A1. Esse peptídeo foi identificado com 100% de identidade com uma proteína de reserva do tipo proteína A de *Vigna luteola* (gene ID [gb|AAZ06660.1|](#)) com íon score de 64.7. Após hidrólise da banda A2 foi possível a identificação de 5 peptídeos. Três peptídeos foram identificados como subunidade alfa da globulina 8S de *Vigna radiata* (Gene ID [gb|ABW23574.1|](#)), e os outros dois peptídeos foram identificados como vicilina de *Vigna unguiculata* (gene ID [emb|CAP19902.1|](#)), entretanto os íons scores ficaram abaixo de 40. Um peptídeo de 7 aminoácidos identificados a partir da banda A2 mostrou-se idêntico a ambas as proteínas acima mencionadas (Tabela 2)

Tabela 2 - Identificação, por espectrometria de massas em MALDI TOF, de peptídeos provenientes da hidrólise trípica de bandas protéicas da fração SI do tegumento de sementes de *Albizia sp*

Spot No.	MS/MS sequencia	Blast score bits	Descrição da Proteína/ ID	Identidad e/ positivida de %
A1	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	64.7	Proteína de reserva proteina A [<i>Vigna luteola</i> gb AAZ06660.1]	100/100
A2	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR TDETAAKVIGR	64.7	Subunidade alfa da globulina 8S [<i>Vigna radiata</i>] gb ABW23574.1]	100/100
	WFHTLFR AILTLVNPDGR QIQNLENYR	37.1	Vicilina [<i>Vigna unguiculata</i>] emb CAP19902.1]	100/100

5.14 - DOSAGEM DE PROTEINASES CISTEÍNICAS E VICILINAS NAS FRAÇÕES CI E SI

Na figura 22, pode ser visto o perfil da dosagem de atividade de proteinase cisteínica do tipo papaína em ambas as frações proteicas CI e SI provenientes do tegumento de *Albizia sp.* Nossos resultados mostraram que a proteinase cisteínica detectável na fração CI (6,9 µg/µL) não foi detectada na fração SI indicando que o processo de exclusão molecular foi eficiente para a separação da proteinase cisteínica e vicilinas (Figura 22A). Adicionalmente, houve uma concentração, de mais de cinco vezes, das proteínas imunorrelacionadas, através do método de ELISA, à vicilinas na fração SI (1,4 µg/mg) (Figura 22B). Esses resultados confirmam as análises de espectrometria de massas que mostra que embora ambas as proteínas estejam juntas na fração CI, na fração SI só são encontradas proteínas identificadas como proteínas de reserva.

Esse experimento necessita ser repetido para que sejam confirmados os resultados aqui mostrados.

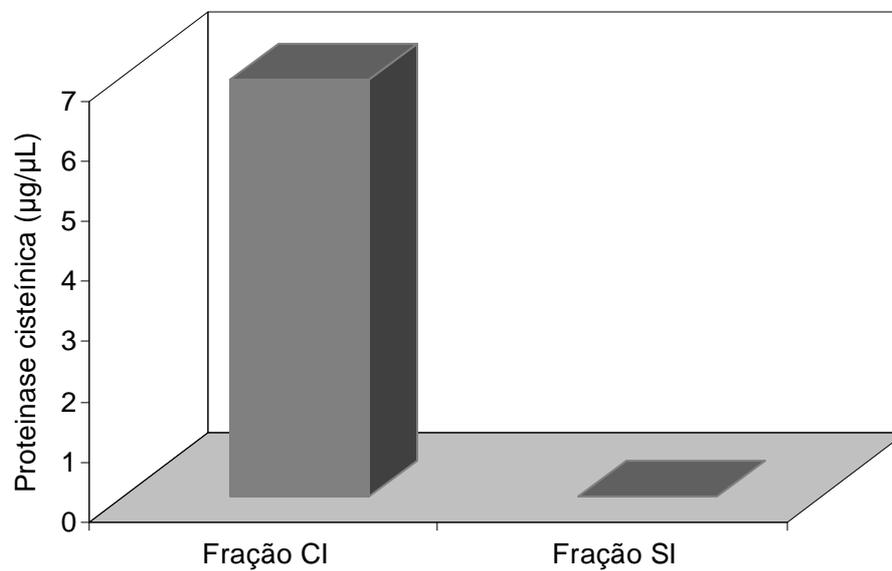
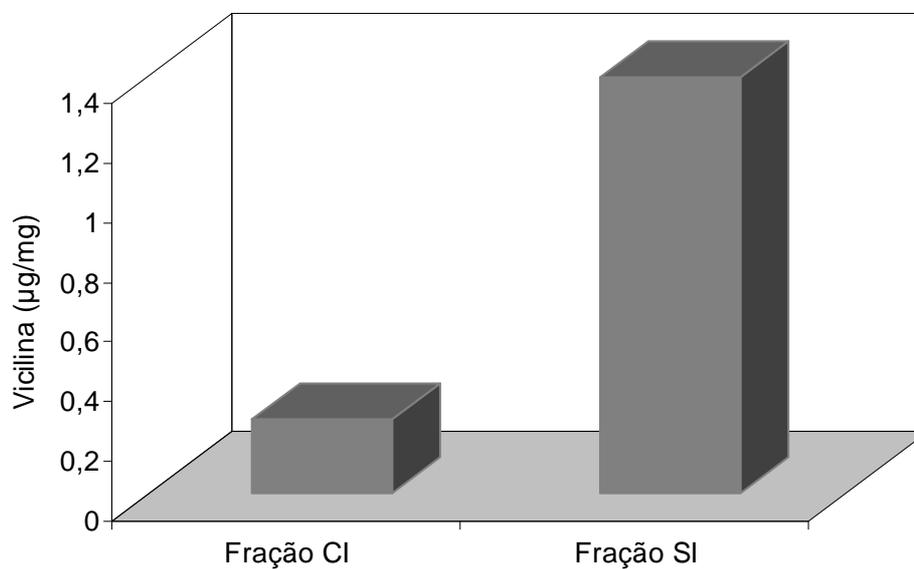
A**B**

Figura 22 - A: Atividade de proteinase cisteínica, B: Dosagem de vicilinas nas frações provenientes das cromatografias de troca iônica (CM-Sepharose) CI e exclusão molecular em Sephacryl S-100, SI do tegumento de sementes de *Albizia sp.*

5.15 – ANÁLISE DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO À QUITINA DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO SI

O perfil cromatográfico da fração SI em coluna de afinidade a quitina mostrou a presença de proteínas nessa fração capazes de interagir com a matriz, indicando uma propriedade de ligação à quitina para essas moléculas. O perfil cromatográfico mostrou a presença de dois picos: um não retido na coluna que foi eluído com tampão acetato de sódio 0,08 M, pH 5.0 e outro retido em quitina que foi eluído com solução de HCl 0,1 M (Figura 23). Visto que proteínas do tipo vicilinas foram previamente detectadas na fração SI a presença dessas moléculas nas frações cromatográficas obtidas na coluna de quitina foi analisada. Todas as frações não-retidas e retidas na coluna de quitina apresentaram proteínas imunorrelacionadas a vicilina, entretanto essas proteínas foram mais concentradas nas frações retidas. A detecção dessas proteínas em ambas as frações não retidas e retidas em quitina pode indicar ou uma possível saturação da coluna ou ainda que algumas isoformas de vicilina presentes em SI não apresentam a capacidade de se ligarem à quitina.

Para que estes resultado sejam confirmados, é necessário que haja repetições deste experimento.

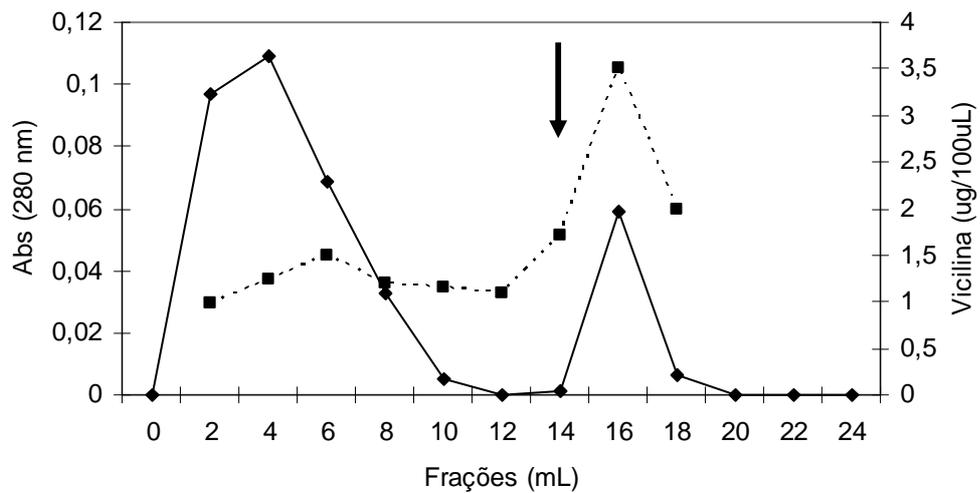


Figura 23 – Cromatografia da fração SI em coluna de quitina e detecção de vicilinas nas frações não retidas e retidas. O material não retido foi eluído com o tampão acetato de sódio 0,08 M, pH 5,0 e o retido com HCL 0,1 M. Foram coletadas frações de 2 mL sob um fluxo de 30 mL/h. A seta indica o início da eluição com HCL.

6 – DISCUSSÃO

Plantas defendem-se contra pestes e patógenos com uma variedade de estratégias químicas e físicas. Entre o arsenal de defesa química, as proteínas vêm recebendo destaque nas últimas décadas (Mota *et al.*, 2003). Exemplos de proteínas de defesa incluem as lectinas, inibidores de enzimas digestivas, quitinases e etc. Formas variantes de vicilinas (globulinas 7S) de cultivares de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) têm sido relacionadas com a resistência desses cultivares ao bruquídeo *C. maculatus* (Macedo *et al.*, 1993; Shutov *et al.*, 1995; Sales *et al.*, 2000; Sales *et al.*, 2001; Sales *et al.*, 2005).

A maioria dos trabalhos que mostram a participação de proteínas em mecanismos de defesa em sementes tem identificado essas moléculas em cotilédones de sementes. Apesar de atualmente ser conhecido que o tegumento exerce outras funções, além de apenas servir como envoltório dos tecidos internos das sementes, poucos estudos têm sido focados na participação deste tecido como barreira química de defesa contra o ataque de insetos e patógenos. O tegumento, ou casca, é a cobertura externa das sementes e o principal modulador das interações entre o embrião e o ambiente externo, sendo então a primeira parte da semente a entrar em contato com os possíveis agressores. Apesar de na década de 70 ter sido mostrado que algumas espécies de insetos têm sucesso na predação de sementes que possuem tegumentos extraordinariamente espessos e duros, enquanto em outras um tegumento fino representa uma barreira intransponível (Janzen, 1977; Thiery, 1984), ainda hoje a importância dos tegumentos dentro dos mecanismos de defesa das sementes é considerada secundária, sendo apenas relacionada à sua dureza e espessura.

Motivados pela possibilidade de gerar plantas mais resistentes, estudos têm se dedicado à construção de plantas transgênicas contendo genes que expressam proteínas tóxicas a insetos e patógenos. Os tecidos alvos na busca de genes para essas transformações têm sido os cotilédones, estruturas de reserva, que juntamente com o eixo embrionário, compõem o embrião (Chrispeels & Raikhel, 1991; Xavier-Filho, 1993). Com a identificação e caracterização de proteínas defensivas no tegumento, espera-se que este tecido possa também figurar como tecido alvo dos programas de manipulação genética de culturas de relevância agrônômica. Diante disso, nosso trabalho teve como principal objetivo

o estudo do envolvimento do tegumento de diversas sementes na resistência à predação pelo bruquídeo *C. maculatus*.

Através de experimentos com sementes de *Phaseolus vulgaris* (cultivares Manteiga e Vermelho), *Vigna vexilata*, *Vigna angularis*, *Dioclea altissima*, *Albizia* sp e *Glycine max* (cultivar comercial e cultivares Tucunará, Elite, Conquista, UFV 20 Florestal, UFUS 2003 e UFUS 2005) infestadas com fêmeas de *C. maculatus*, foi possível observar que todas apresentam algum grau de interferência no desenvolvimento normal do bruquídeo *C. maculatus*. Diminuições nos números de ovos postos, larvas eclodidas, larvas que perfuraram os tegumentos, bem como insetos adultos emergidos, foram observadas em todas as sementes estudadas. Entretanto o percentual de diminuição foi bastante variável de semente para semente. As larvas que tiveram sucesso na perfuração completa do tegumento levaram mais tempo para alcançar os cotilédones do que a larva que atravessou o tegumento das sementes hospedeiras. Enquanto na semente hospedeira (*V. unguiculata* cv. Fradinho), no 6º dia após a oviposição, a larva já havia atravessado o tegumento, nas outras sementes esse tempo variou de 9 a 20 dias, sendo que os maiores valores foram observados para as sementes de soja dos cultivares UFUS 2003 e 2005 com 19 e 20 dias, respectivamente. Os resultados obtidos com as sementes de *P. vulgaris* (cvs. Manteiga e Vermelho) confirmam os previamente obtidos por Santos (2007), que verificou que entre essas duas cultivares, a cultivar Vermelho se mostrou mais tóxica a esse bruquídeo, tendo um menor número de ovos eclodidos e larvas que atravessaram o tegumento após 20 dias.

Para avaliarmos especificamente a interferência dos tegumentos no desenvolvimento larval, experimentos de sementes artificiais recobertas com tegumentos naturais foram feitos usando-se tegumentos de diferentes cultivares de soja. Foi observada uma alta variação na oviposição, no número de ovos eclodidos, de larvas que atravessaram o tegumento e de larvas mortas dentro do ovo. Quando analisamos as massas das larvas que tiveram sucesso ao atravessar o tegumento, observamos pesos médios inferiores aos das larvas controle (que atravessaram o tegumento de *V. unguiculata*). Essas reduções atingiram percentuais de até 88% na massa das larvas de 20 dias de idade.

Estudos realizados com *C. maculatus* infestando sementes de 73 espécies não-hospedeiras, evidenciaram claramente a participação de compostos químicos

do tegumento nos mecanismos de resistência dessas sementes (Janzen, 1977). Neste trabalho, foi analisada a relação entre a espessura e dureza do tegumento com a sobrevivência ou morte das larvas desse bruquídeo nos primeiros estágios do desenvolvimento. Os resultados mostraram que não há nenhuma relação entre tegumentos espessos e duros com a mortalidade das larvas (Janzen, 1977), e que compostos químicos devem estar envolvidos nessa mortalidade. Isso está de acordo com nossos resultados, pois após infestarmos uma variedade de sementes com diferentes níveis de dureza e espessura nos seus tegumentos, pudemos verificar que não somente essas características estão determinando a resistência das sementes, mas é possível que compostos tóxicos presentes nos tegumentos, estejam causando essa variabilidade na resistência/susceptibilidade ao bruquídeo. Nas diferentes cultivares de soja testadas, por exemplo, há variação na resistência, apesar de não haver diferenças significativas no grau de espessura de seus tegumentos (dados não mostrados), indicando diferenças químicas entre elas. Em um outro trabalho, ainda foram vistas consideráveis variações na mortalidade no primeiro estágio larval de desenvolvimento do inseto *Acanthoscelides obtectus*, quando estes desenvolveram-se em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Thiery, 1984).

Dentre todas as sementes estudadas, a que se mostrou mais tóxica, sendo capaz de até mesmo impedir a perfuração do tegumento e entrada do inseto, foi a semente de *Albizia sp.* Nossos resultados também mostraram uma grande toxicidade da farinha desse tecido para as larvas do inseto, com valores de WD_{50} , LD_{50} e LD de 0,3 %, 1% e 2% respectivamente. Esses resultados confirmam os previamente obtidos por Souza (2006), que já havia visto que esse tegumento serve como barreira contra a penetração do bruquídeo *C. maculatus*.

Devido a essa alta toxicidade da farinha dos tegumentos de *Albizia sp.*, esse tecido foi escolhido para o isolamento e caracterização de possíveis proteínas tóxicas. O fracionamento do extrato protéico do tegumento em CM-Sepharose gerou uma fração não retida (CI) que, quando incorporada em sementes artificiais, foi extremamente tóxica ao desenvolvimento das larvas do inseto. O perfil protéico dessa fração mostrou a presença de três bandas protéicas com massas moleculares entre 34,7 kDa e 45 kDa e uma proteína majoritária próximas a 18,4 kDa. Peptídeos provenientes das proteínas com massas moleculares entre 34,7 e 45 kDa mostraram-se idênticos a vicilina

(proteínas de reserva do tipo globulina 7S) de *Vigna unguiculata*, proteína de reservas do tipo proteína A e proteína B de *Vigna luteola* e globulina 8S de *Vigna radiata*, enquanto a proteína majoritária foi identificada como proteinase cisteínica de *Hordeum vulgare* e *Solanum chacoense*. Parte dessas proteínas apresentou capacidade de ligação à quitina, entretanto proteínas imunorrelacionadas a vicilinas, bem como proteínas com atividade de proteinase cisteínica foram detectadas tanto nas frações retidas como não retidas na coluna de quitina. Esses resultados podem indicar ou uma possível saturação da coluna ou ainda que algumas isoformas ou subunidades dessas proteínas não se ligam à quitina. De qualquer forma essa afinidade a quitina pode indicar para um possível mecanismo de toxicidade.

A propriedade de ligação à quitina apresentada pelas vicilinas, tem sido descrita por alguns autores. Yunes *et al.* (1998) mostraram que vicilinas das sementes das leguminosas *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Glycine max*, *Canavalia ensiformis*, *V. unguiculata* e outras, ligam-se a matrizes de quitina. Isoformas variantes de vicilinas, também com propriedades de ligação à quitina, presentes nos genótipos africanos de *V. unguiculata* (IT81D-1045, IT81D-1032 e TVu-2027) foram consideradas o principal fator de resistência contra *C. maculatus* (Macedo *et al.*, 1993). Ainda, outros trabalhos mostraram que vicilinas se ligam a estruturas que contêm quitina no intestino médio desses insetos (Sales *et al.*, 1996; Firmino *et al.*, 1996). Essas vicilinas também inibiram o crescimento de microrganismos, como é o caso dos fungos, que contêm quitina como parte de sua parede celular (Gomes *et al.* 1997).

Trabalhos realizados por Santos (2007) e Conceição (2008) confirmaram a presença de quitinases no tegumento de sementes de soja que foram tóxicas para o inseto *C. maculatus*. Santos (2007) detectou proteínas imunorrelacionadas a quitinases nos órgãos das larvas alimentadas com essa proteína.

O mecanismo de ação das vicilinas sobre os bruquídeos ainda não está completamente esclarecido, mas análises químicas e imunológicas sugerem que essa toxicidade possa estar relacionada à propriedade de ligação à quitina (Sales *et al.*, 2001). A observação de que vicilinas de leguminosas se ligam à quitina levou a descoberta de que as vicilinas de feijão-de-corda e outras leguminosas se ligam fortemente a várias estruturas do intestino médio de ambos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* (Firmino *et al.*, 1996; Sales *et al.*, 1996; Sales *et al.*, 2001) e

paredes celulares ou membranas plasmáticas de fungos filamentosos e leveduras (Gomes *et al.*, 1998).

Trabalhos do nosso grupo identificaram proteínas do tegumento de várias sementes que foram tóxicas a este bruquídeo, como no tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis* (Oliveira *et al.*, 1999), *Phaseolus lunatus* (Moraes *et al.*, 2000) e *Phaseolus vulgaris* (Silva *et al.*, 2004). Estas apresentaram homologia de seqüência de aminoácidos com vicilinas (proteínas de reserva do tipo globulinas 7S).

Como mencionado anteriormente, proteínas do tipo proteinase cisteínica foram também identificadas na fração tóxica ao inseto e atividades relacionadas a essa proteinase foram identificadas em frações retidas em quitina. Diversos trabalhos mostram que as proteinases cisteínicas são as principais classes de enzimas digestivas presentes no trato digestivo de bruquídeos, (Murdock *et al.*, 1987; Campos *et al.*, 1989; Silva & Xavier-Filho, 1991), não sendo esperada a associação entre a proteinase cisteínica da fração CI com a toxicidade ao inseto *C. maculatus*. Entretanto, alguns trabalhos recentes têm mostrado a ligação de proteinases cisteínicas a estruturas intestinais de insetos, alterando seu desenvolvimento normal. Pechan *et al.* (2000), identificaram uma proteinase cisteínica do tipo papaína, com peso molecular em torno de 33 kD, denominada Mir1-CP que atua na defesa de milho contra a herbivoria de larvas de *Spodoptera frugiperda*. Esta proteinase acumula-se rapidamente em folhas de milho de genótipos resistentes, em resposta ao ataque de insetos lepidópteros e mostrou inibir o crescimento de larvas *in vivo*, por permeabilizar sua membrana peritrófica. Ao perfurar essa membrana, a proteinase cisteínica facilita a absorção de outras proteínas inseticidas pelo intestino médio, tornando o inseto susceptível à ação tóxica dessas proteínas (Mohan *et al.*, 2006; Mohan *et al.*, 2008).

Baseados nesses trabalhos, foi investigada a capacidade de ligação das proteinases cisteínicas com o intestino de larvas de *C. maculatus*. Nossos resultados mostraram que atividade de proteinases cisteínicas foi detectada no nessas larvas, principalmente em frações do intestino. Esses resultados confirmam o previamente descrito na literatura que descreve essas enzimas como presentes no trato intestinal de insetos bruquídeos (Murdock *et al.*, 1987; Campos, *et al.*, 1989; Silva & Xavier-Filho, 1991). Entretanto quando os intestinos das larvas alimentadas com a fração CI, foram solubilizados com o detergente triton,

uma alta atividade para proteinases cisteínica foi observada. Esses resultados sugerem uma possível ligação dessas proteínas a estruturas intestinais dessas larvas ou ainda um aumento das proteinases cisteínicas endógenas em resposta ao consumo da fração CI. Embora proteinases cisteínicas estejam presentes na fração CI, não podemos afirmar que essas proteinases estejam participando da toxicidade para *C. maculatus*.

O intestino médio de muitos insetos é revestido internamente por uma matriz peritrófica que envolve o alimento no trato digestivo, sendo formada por quitina e proteínas (Peters, 1992). A quitina é constituinte de matrizes peritróficas de insetos, que representa uma membrana (matriz) não celular composta de uma mistura complexa de quitina, proteínas, glicoproteínas e conjugados proteoglicanos. A matriz peritrófica funciona como uma barreira permeabilizante seletiva entre o bolo alimentar e o epitélio do intestino melhorando processos digestivos e funcionando também como uma proteção mecânica contra toxinas e patógenos (Tellam, 1996). Matrizes peritróficas de insetos têm sido classificadas em duas classes, baseando-se na forma em que são sintetizadas (Wigglesworth, 1930; Peters, 1992). O tipo I de matrizes peritróficas é sintetizado ao longo do intestino e o tipo II é produzido por células especializadas na região entre o esôfago e o intestino anterior. Matrizes peritróficas de insetos geralmente apresentam de 3% a 13% de quitina (Peters, 1992).

Apesar de não ser clara a presença de uma membrana peritrófica propriamente dita em *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, Sales *et al.* (2006) mostraram que os intestinos médios desses insetos possuem estruturas que contêm quitina. Neste trabalho ainda foi observado, através de ensaios imunocitoquímicos, que há reconhecimento de anticorpo anti-vicilina nas bordas das microvilosidades das paredes intestinais de grupo de larvas alimentadas com vicilinas de feijão de corda de cultivares resistentes e susceptíveis. Ensaio utilizando IgG contra quitina revelaram uma forte reação de reconhecimento positivo na mesma região próxima as microvilosidades, o que demonstra uma vez mais a presença de quitina em estruturas diferentes de uma membrana peritrófica, sugerindo que as larvas de *C. maculatus* desenvolveram uma estrutura quitinosa diferente de uma membrana peritrófica típica. Resultados posteriores confirmaram essa hipótese, ao mostrarem que vicilinas apresentam a propriedade de se ligar reversivelmente a matrizes de quitina, e que formas variantes de

vicilina podem ligar-se a matrizes de quitina do intestino médio de *C. maculatus*, impedindo o desenvolvimento da larva no interior da semente (Sales *et al.*, 2001)

Quando a membrana é atacada e degradada pela ação de proteínas ou outros compostos, o inseto fica vulnerável, já que esta representa uma primeira linha de defesa para os insetos que a possuem, e isso pode ser letal a este organismo (Mohan *et al.*, 2006). Em parte, isso pode ajudar a explicar o possível mecanismo de toxicidade da fração CI sobre as larvas de *C. maculatus*, observada em nossos resultados.

Como indicado por trabalhos anteriores, proteinases cisteínicas podem ser responsáveis pelo ataque a matriz peritrófica de lepidópteras, alterando sua permeabilidade (Mohan *et al.*, 2006; Mohan *et al.*, 2008), desta forma fomos investigar uma possível interferência da fração CI na permeabilização das paredes intestinais das larvas de *C. maculatus*. Nossos resultados mostraram que após 16 dias de desenvolvimento, o corante blue dextran estava concentrado exclusivamente no intestino das larvas, indicando que não houve permeabilidade do intestino ao corante, que tem uma massa molecular de aproximadamente 2.000.000 Da. Um dado intrigante observado nesses experimentos é que as larvas controle (crescidas em sementes contendo apenas 1 % de blue dextran) não apresentaram corante no trato digestivo (dados não mostrados). Esses resultados levantam para a possibilidade de que a fração CI possa interferir em processos como a digestão, absorção e/ou excreção larval. O bloqueio desses processos fisiológicos poderia justificar o acúmulo deste corante no intestino das larvas alimentadas com essa fração.

Proteínas tóxicas têm sido detectadas em vários tecidos e órgãos de insetos. Trabalhos recentes mostraram proteínas do tipo vicilinas de sementes de *V. unguiculata* na hemolinfa, no lúmen intestinal, nas células do epitélio intestinal, no corpo gorduroso, e nos túbulos de Malpighi de larvas de *C. maculatus* e também, na hemolinfa de larvas de *Zabrotes subfasciatus* e corpo gorduroso de insetos adultos, mostrando uma possível ação sistêmica dessa proteína (Uchôa *et al.*, 2006).

Vicilinas de *V. unguiculata* do genótipo IT81D-1045, que é resistente ao ataque pelo caruncho do feijão-de-corda, mostraram ligar-se à membrana peritrófica da larva da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* e a taxa de sobrevivência deste inseto foi reduzida significativamente (Mota *et al.*, 2003).

Ainda, em um trabalho recente de nosso grupo, foi mostrado que ambas vicilinas dos genótipos EPACE-10 e IT81D-1045 foram tóxicas para larvas de *Tenebrio molitor*, e essas proteínas foram capazes de se ligar à membrana peritrófica dessas larvas. Esses resultados sugerem que a associação entre vicilinas e a membrana peritrófica deste inseto pode estar relacionada à capacidade de ligação à quitina por essas proteínas e que essa capacidade de ligação pode em parte explicar a toxicidade de vicilinas (Paes *et al.*, 2008).

Proteinases cisteínicas e proteínas de reserva são proteínas alvo de estudos nos processos de germinação de sementes, pois ambas participam dos processos de mobilização de reservas energéticas em sementes. Proteínas de reserva de leguminosas compreendem de 20 a 80% das proteínas presentes nas sementes quiescentes. Estudando sementes de *Vigna radiata*, Tecson-Mendoza *et al.* (2001), verificaram que a fração das proteínas de reserva dessas sementes era constituída de globulinas básicas 7S, vicilinas, globulinas 8S e leguminas (globulinas 11S). A principal proteína de reserva, a globulina 8S, na sua forma nativa apresentou massa molecular de 200 kDa, e quando analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, revelou quatro bandas com massas moleculares de 60, 48, 32 e 26 kDa (Bhattacharya & Biswas, 1990).

Proteinases cisteínicas são enzimas do tipo hidrolases endoproteinases que possuem um resíduo de cisteína no seu sítio ativo (Grudkowska & Zagdanska, 2004), e parecem estar envolvidas em praticamente todos os aspectos fisiológicos e de desenvolvimento da planta. São essenciais no desenvolvimento, senescência, morte celular programada, mobilização de proteínas de reserva e respostas a vários tipos de estresse ambiental além de participarem do “turnover” protéico em animais e plantas (Wisniewski & Zagdanska, 2001). Dentre todas essas funções, a mais conhecida e investigada é a função da proteinase cisteínica de mobilização de reservas protéicas em eventos pré-germinativos, germinativos e pós-germinativos (Wan *et al.*, 2002).

Embora a fração CI tenha sido muito tóxica ao inseto e que ambas as classes de proteínas presentes nessa fração se liguem à quitina, não temos como avaliar a participação de cada uma dessas proteínas na toxicidade da fração, até que elas sejam separadas e avaliadas novamente. Na tentativa do isolamento dessas proteínas a fração CI foi submetida a cromatografia de exclusão molecular e obtivemos 3 picos principais, entretanto só a fração SI foi possível acumular em

quantidade suficiente para os testes com os insetos. Em concentração de 0,1 % essa fração reduziu em quase 80% a massa das larvas de *C. maculatus*, além de reduzir consideravelmente o número de larvas sobreviventes após os 20 dias. O perfil eletroforético da fração SI mostrou 2 bandas protéicas principais próximas a 45 kDa (dados não mostrados). Peptídeos provenientes dessas bandas protéicas quando analisados por espectrometria de massas em MALDI TOF foram idênticos a peptídeos de uma proteína de reserva do tipo proteína A de *Vigna luteola*, da subunidade alfa da globulina 8S de *Vigna radiata* e de vicilina de *Vigna unguiculata*. Atividade de proteinases cisteínicas detectável na fração CI não foi detectada na fração SI indicando que o processo de exclusão molecular foi eficiente para a separação da proteinase cisteínica e vicilinas. Por ensaios de ELISA, observamos uma considerável concentração das proteínas imunorrelacionadas a vicilinas na fração SI.

Para reavaliarmos a propriedade de ligação à quitina das vicilinas de tegumentos de *Albizia*, a fração SI foi cromatografada em coluna de quitina. Nossos resultados confirmaram a presença de vicilina tanto nas frações não-retidas como retidas na coluna. Entretanto essas proteínas foram mais concentradas nas frações retidas. A detecção dessas proteínas em ambas as frações não retidas e retidas em quitina pode indicar ou uma possível saturação da coluna ou ainda que algumas isoformas de vicilina presentes em SI não apresentam a capacidade de se ligarem à quitina.

Nossos resultados confirmam a toxicidade de vicilinas do tegumento de sementes de *Albizia sp* para *C. maculatus* e sugerem sua afinidade a quitina como um possível mecanismo de ação.

Experimentos posteriores são indispensáveis e serão feitos com o objetivo de purificarmos a proteinase cisteínica e avaliarmos seus efeitos sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus*.

O estudo dos mecanismos de toxicidade de tegumento de sementes para *C. maculatus* pode nos esclarecer acerca dos mecanismos envolvidos nesse tipo de proteção e futuramente, auxiliar nos processos de obtenção de plantas resistentes ao ataque de insetos. Tal estratégia poderá permitir que os danos em sementes causados por esses ataques sejam reduzidos, já que a resistência seria antecipada para os tegumentos, que é o primeiro tecido a entrar em contato com o agressor.

7 – CONCLUSÕES

- Sementes de *Phaseolus vulgaris* (cultivares Manteiga e Vermelho), sementes de *Vigna vexilata*, *Vigna angularis*, *Dioclea altissima*, *Albizia sp*, e *Glycine max* (cultivar comercial e cultivares Tucunaré, Elite, Conquista, UFV 20 Florestal, UFUS 2003 e UFUS 2005) foram capazes de alterar o desenvolvimento de *C. maculatus*, se comparado ao seu desenvolvimento em sementes hospedeiras;
- Quando desenvolvidas nas sementes acima citadas, o bruquídeo *C. maculatus* apresentou redução na taxa de oviposição, no número de ovos eclodidos e ainda, na taxa de emergência de larvas após 20 e 40 dias;
- Dentre todos os tegumentos de sementes naturais estudados e testados quanto à toxicidade para *C. maculatus*, o tegumento de sementes de *Albizia sp* foi o que se mostrou mais tóxico, tendo conseguido impedir em 100 % a sobrevivência desses insetos;
- O tegumento de sementes de *Albizia sp* foi capaz de reduzir a oviposição das fêmeas de *C. maculatus*, além de interferir na viabilidade dos ovos e penetração de larvas nos cotilédones;
- A farinha do tegumento de *Albizia sp* foi tóxica ao desenvolvimento de *C. maculatus*, reduzindo a massa e o número de larvas;
- A fração CI (não-retida) obtida da cromatografia do extrato do tegumento de *Albizia sp* em CM-Sepharose foi extremamente tóxica para as larvas de *C. maculatus*. As proteínas presentes nessa fração tiveram suas seqüências de aminoácidos parcialmente identificadas, e revelaram-se homólogas a proteinases cisteínicas e globulinas (7S e 8S);
- A fração CI apresentou a propriedade de ligar-se à quitina;

- A fração CI e frações retidas e não-retidas desta amostra em coluna de quitina, exibiram atividade de proteinase cisteínica do tipo papaína;
- Foi detectada a presença de vicilina na fração CI e nas frações retidas e não-retidas desta fração em cromatografia de quitina;
- A fração SI, depois de analisada, revelou homologia à globulina 8S e foi extremamente tóxica a *C. maculatus* (concentração de 0,1 %);
- A fração SI não apresentou atividade de proteinase cisteínica do tipo papaína, entretanto, foi imunologicamente reativa a anticorpos anti-vicilina;
- Assim como a fração CI, a fração SI (fração globulínica) apresentou a propriedade de se ligar à quitina.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. (1988). How Plants Defend Themselves Against Pathogens. Plant Pathology. 3rd. ed., Academic Press Inc., London, pp 97-115.
- Appleby, J. H. & Credland, P. F. (2004). Environmental conditions affect the response of West African *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) populations to susceptible and resistance cowpeas. J. Stored Prod. Res 40: 269-287.
- Araújo, J. P. P. & Watt, E. E. (1988). O caupi no Brasil. 1^o Edição. Departamento de Publicações, Brasília – DF, IITA-EMBRAPA, 21: 639-641.
- Araújo, C. L., Bezerra, I. W. L., Oliveira, A. S., Moura, F. T., Macedo, L. L. P., Gomes, C. E. M., Barbosa, A. E. A. D., Macedo, F. P., Souza, T. N. M. S., Franco, O. L., B-J., C. & Sales, M. P. (2005). In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. J. Agric. Food Chem. 53 (11): 4381-4387.
- Bahagiawati, A., Shade, R. E., Koiwa, H., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Murdock, L. L. & Zhu Salzman, K. (2007). Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. J. Insect Physiol., 53: 734-740.
- Bastos, J. A. M. (1981). Principais pragas de cultivares e seus controles. Nobel, p. 50-84.
- Bhattacharya, S. P. & Biswas, B. B. (1990). Purification and characterization of high salt-soluble vicilin from mungbean (*Vigna radiata*). Biochem. Int., 21: 667-675.
- Bewley, J. D. & Black, M. (1994). In: Seeds: Physiology of Development and Germination. 2^o ed. New York: Plenum Press, p. 40-50.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. Plant Cell 9:1055-1066.

- Campos, F. A. P., Xavier-Filho, J. Silva, C. P. & Ary, M. B. (1989). Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 92: (B), 51-57.
- Carasco, J.F., Croy, R., Derbyshire, E. & Boulter, D. (1978). The isolation and characterization of the major polypeptides of the seed globulin of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their sequential synthesis in developing seeds. *J. Exp. Bot.*, 29: 309-323.
- Carlini, C. R & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.
- Chrispeels, M. J. & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell* 3: 1-9.
- Conceição, J. G. (2008). Quitinases do tegumento de soja (*Glycine max*). Monografia (Licenciatura em Biologia). Campos dos Goytacazes, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).
- Credland, P. F. & Dendy, J. (1992). Intraespecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. *Entomol. Exp. Appl.*, 65: 39-47.
- Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (1998). The biological roles of legume seed vicilins (7S storage proteins). *Trends Comp. Biochem. Physiol.*, 4: 241-245.
- Fields, P. G., Xie, Y. S. & Hou, X. (2001). Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *J. Stored. Prod. Res.* 37: 359-370.
- Firmino, F., Fernandes, K. V. S., Sales, M. P., Gomes, V. M., Miranda, M. R. A., Domingues, S. J. S. & Xavier-Filho, J. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 749-756.
- Gallo, D., Nakako, O., Silveira Neto, S., Carvallho, R. P. L., Batista, G. C., Berti,

8. Referências Bibliográficas

- E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B. & Vendramim, J. D. (1988) . Em: Manual de Entomologia Agrícola. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 649p.
- Gizjen, M., Kuflu, K., Qutob, D. & Chernys, J. T. (2001). A class I chitinase from soybean seed coat. J. Exp. Bot., 52: 2283-2289.
- Gomes, V. M. & Xavier-Filho, J. (1994). Biochemical defenses of plants. Arq. Biol. Technol., 37 (2): 371-383.
- Gomes, V. M., Mosqueda, M. I., Blanco-Labra, A., Sales, M. P., Fernandes, K. V. S., Cordeiro, R. A., & Xavier-Filho, J. (1997). Vicilin storage proteins from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. J. Agric. Food Chem., 45(10): 4110-4115.
- Gomes, V. M., Okorokov, Lev. A., Rose, T. L., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (1998). Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1379: 207-216.
- Grudkowska, M. & Zandanska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. Acta Biochem. Pol. 51: 609–624.
- Hall, A. E., Singh, B. B. & Ehlers, J. D. (1997). Cowpea breeding. Plant Breed. Rev. 15: 217-224.
- Hao, Q. Van Damme, E. J. M., Hause, B., Barre, A., Chen, Y., Rouge, P. & Peumans, W. J. (2001). Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome inactivating proteins with unusual properties. Plant Physiol., 125: 866-876.
- Haruta, M., Major, I. T., Christopher, M. E., Patton, J. J. & Constabel, C. P. (2001). A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. Plant Mol. Biol. 46:347-359.
- Iton, T., Garcia, R. N., Adachi, M., Maruyama, Y., Tecson-Mendoza, E. M., Mikami, B. & Utsumi, S. (2006). Structure of 8S α globulin, the major seed storage protein of mung bean. Acta Cryst. D62: 824-832.
- Janzen, D. H. (1977). How southern cowpea weevil larvae (Bruchidae: *Callosobruchus maculatus*) die on nonhost seeds. Ecology, 58: 921-927.

- Khan, M.R.I., Gatehouse, J.A, and Boulter, D. (1980). The seed proteins of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). J. Exp. Bot., 31: 1599.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., Kohno, K. (2004). Papain protect papaya trees from herbivorous insects : role of cysteine proteases in latex. Plant J., 37: 370-378.
- Kornegay, J. C., Cardona, C. & Posso, C. E. (1993) Inheritance of resistance to Mexican bean weevil in common bean, determined by bioassay and biochemical tests. Crop Sci. 33: 589-594.
- Krüger, J., Thomas, C. M., Golstein, C., Dixon, M. S., Smoker, M, Tang, S., Mulder, L., Jones, J. D. G. (2002). A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of tomato necrosis. Science, 296: 744-747.
- Kozlowski, T. T. (1972). In: Seed Biology. V.II. 2nd ed.. Wiley, New York, pp 4-1114.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Liu, Y. L., Salzman, R. A., Pankiw, T. & Zhu-Salzman, K. (2004). Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. Insect Biochem. Mol. Biol., 34: 1069-1077.
- Macedo, M. L. R., L. B. S. Andrade, R. A. Moraes & J. Xavier-Filho (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Comp. Biochem. Physiol. 105C: 89-94.
- Macedo, M.L.R.; Fernandes, K.V.S.; Sales, M.P. & Xavier-Filho J. (1995). Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible and resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. Braz. J. Med. Biol. Res., 28: 183-190.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2002). An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 130: 1807-1814.

8. Referências Bibliográficas

- Mazzonetto, F. & Vendramim, J. D. (2002). Aspectos fisiológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em genótipos de feijoeiro com e sem arcelina. *Neotrop. Entom.*, 31(3): 435-439.
- Mello, M. O. & Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant. Physiol.*, 14(2):71-81.
- Michaud, D.; Nguyen-Quoc, B.; Bernier-Vadnais, N.; Faye, L. & Yelle, S. (1994). Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. *Physiol. Plant*, 90: 497-503. In: Oliveira, L.O. (2007). Atividades de proteinases cisteínicas e de seus inibidores do tipo cistatinas durante a germinação de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Monografia - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- Moise, A. J., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, A. D. & Mikic, A. L. B. (2005). Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In vitro Cell. Devel. Biol. – Plant.*, 41(41): 620-644.
- Mohan, S., Ma, P. W. K., Pechan, T., Bassford, E. R., Williams, W. P. & Luthe, D. S. (2006). Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *J. Insect Physiol.*, 52:21-28.
- Mohan, S., Ma, P. W. K., Williams, W. P. & Luthe, D. S. (2008). A naturally occurring plant cysteine protease possesses remarkable toxicity against insect pests and synergizes *Bacillus thuringiensis* toxin. *PLoS ONE*, 3(3): e1786.
- Mookherjee, P. B. & Chawla, M. L. (1964). Effect of temperature and humidity on the development of *Callosobruchus maculatus*. Fab. A serious pest of stored pulses. *Indian J.*, 26(3): 345-351.
- Moraes, R. A., Sales, M. P., Pinto, M. S. P., Silva, L. B., Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (2000). Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33: 191-198.
- Mota, A. C., Damatta, R. A., Lima Filho, M., Silva, C. P. & Xavier-Filho, J. (2003). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval
- Souza, A. J. (2009)*

- sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). J. Insect Physiol. 49 (9): 873-880.
- Muntz, K. (1996). Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. J. Exp. Bot., Vol. 47, No. 298, pp. 605-622.
- Murad, A. M., Laumann, R. A., Lima, T. De A., Sarmiento, R. B., Noronha, E. F., Rocha, T. L., Valadares-Inglis, M. C. & Franco, O. L. (2006). Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoeskeleton. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 142(3-4): 365-370.
- Murdock, L. L., Broohhart, G., Dunn, E. D., Foard, Kelley, S., Kitch, L., Shade R. E., Shukle, R. H. & Wolfson, J. L. (1987). Cysteine digestive proteinase in Coleoptera, *Comp. Biochem. Physiol.* **87** (B): 783–787.
- Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schonbeck, F. & Weber, A. (1994). Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops, Elsevier, Amsterdam.
- Oliveira, A. E. A., Sales, M. P., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (1999). The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC cotyledonary and testa proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.)). Entomol. Exp. Appl., 92: 249-255.
- Oliveira, A. E. A., Sasaki, G. L., Iacomini, M., Cunha, M., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (2002). Isolation and characterization of a galactorhamnan polysaccharide from the seed coat of *Canavalia ensiformis* that is toxic to the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. Entomol. Exp. Appl., 101(3): 25-231.
- Paes, E. V., Uchôa, A. F., Pinto, M. S. T., Silva, C. P., Fernandes, K. V. S., Oliveira, A. E. A. & Xavier-Filho, J. (2008). Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. Entomol. Exp. App., 129: 11-17.
- Pechan, T., Ye, L. J., Chang, Y. M., Mitra, A., Lin, L., Davis, F. M., Williams, W. P., Souza, A. J. (2009)

- Luthe, D. S. (2000). A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other lepdoptera. *Plant Cell*, 12: 1031-1040.
- Pedra, J. H. F., Brandt, A., Westerman, R., Lobo, N., Li, H. M., Romero-Severson, J., Murdock, L. L. & Pittendrigh, B. R. (2003). Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and alpha-amylases associated with food breakdown. *Insect Mol. Biol.*, 12: 405-412.
- Pereira, P. A. A., Yokoyama, M., Quintela, E. D. & Bliss, F. A. (1995). Controle do caruncho *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) pelo uso de proteína da semente em linhagens quase isogênicas de feijoeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 30: 1031-1034.
- Peters, W. (1992). Peritrophic membranes. In *Zoophysiology*, vol. 30. Fisiologia da semente. 2ª .ed., Brasília, 1985. 289p.
- Quintela, E. D., Neves, B. P. das, Quinderé, M. A. W. & Roberts, D. W. (1991). Principais Plagas Del *Caupi* Em El Brasil. Goiânia: Embrapa-Cnpaf. (Embrapa-Cnpaf. Documentos, 35).
- Rosolem, C. A. & Marubayashi, O. M. (1994). Seja o doutor do seu feijoeiro. *Potafós: Arquivo do Agrônomo* 7, 16p.
- Ryan, C. A. (1990). Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425-449.
- Sadeghi , A., Van Damme, Els. J. M., Peumans, W. J. & Smagghe, G. (2006). Deterrent activity of plants lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. *Phytochemistry* , 67: 2078-2084.
- Sales, M. P., Macedo, M. L. & Xavier-Filho, J. (1992). Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinsases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103b(4): 945-950.
- Sales, M. P., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (1996). Chitin-Binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 319-326.
- Sales, M. P. (1996). Mecanismos de ação de vicilinas variantes de *Vigna*
- Souza, A. J. (2009)*

- unguiculata* (L.) Walp para larvas de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Tese (doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, p. 49.
- Sales, M. P., Gerhardt, I. R. Grossi-de-Sá, M. F. & Xavier-Filho, J. (2000) Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiol.* 124: 515-522.
- Sales, M. P., Pimenta, P. P., Paes, N. S., Grossi-de-Sá, M. F. & Xavier-Filho, J. (2001). Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34: 27-34.
- Sales, M. P., Andrade, L. B. S., Ary, M. B., Miranda, M. R. A., Teixeira, F. M., Oliveira, A. S., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (2005). Performance of bean bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (EPACE-10) *Vigna unguiculata* seeds: Relationship with trypsin inhibitor and vicilin excretion. *Comp. Biochem. Physiol.*, 142: 422-426.
- Santos, P. O. (2004). Investigação da Toxicidade do Tegumento de Soja (*Glycine max*) para o Gorgulho do Feijão-de-corda (*Callosobruchus maculatus*) e Fungos Fitopatogênicos. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Campos dos Goytacazes Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).
- Santos, P. O. (2007). Tegumentos de sementes como barreiras químicas de defesa contra o ataque do inseto *Callosobruchus maculatus* e fungos fitopatogênicos. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia). Campos dos Goytacazes, RJ. Centro de Biociências, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), 88p.
- Santos, P. O., Santos, I. S., Gomes, V, M., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. & Oliveira, A. E. A. (2008). *In vitro* evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. *J. Stored Prod. Res.*, 44: 310-315.
- Shewry, P.R. & Casey, R. (eds). (1999). Seed protein. Dordrecht: Kluwer.

- Academic. Publishers. Apud: Müntz, k.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A. & Tiedeman, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.*, 52 (362): 1741-1752.
- Shutov, A.D., Karhovskaya, I.A., Braun, H., Baümlein, H. & Müntz, K. (1995). Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. *J. Mol. Evol.*, 41: 1057-1069.
- Silva, C. P. & Xavier-Filho, J. (1991). Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera, Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol. B- Biochem. Mol. Biol.*, 99: 529-533.
- Silva, L. B., Sales, M. P., Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (2004). The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)]. *An. Braz. Acad. Sci.*, 76 (1): 57-65.
- Southgate, B. J. (1979). Biology of the Bruchidae. *Ann. Ver. Entomol.*, 24 (1): 449-473.
- Souza, A. J. (2006). Tegumento de sementes de *Albizia sp* como barreira contra a penetração dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Campos dos Goytacazes, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).
- Tecson-Mendoza, E. M., Adachi, M., Bernardo, A. E. N. & Utsumi, S. (2001). Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] globulins: purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1552-1558.
- Tellam, R. L. The peritrophic matrix. In: *Biology of the Insect Midgut* (ed. M. J. Lehane and P. F. Billingsley), pp. 86-114. Cambridge: Chapman and Hall.(1996).
- Thiery, D. (1984). Hardness of some fabaceous seed coats in relation to larval penetration by *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.*, 20(4): 177-181.

8. Referências Bibliográficas

- Tiedemann, J., Neubohn, B. & Müntz, K. (2000). Different functions of vicilina and legumin are reflected in the histopatter of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). *Planta*, 211: 1-12.
- Uchôa, A. F., DaMatta, R. A., Retamal, C. A., Albuquerque-Cunha, J. M., Souza, S. M., Samuels, R. I., Silva, C. P. & Xavier-Filho, J. (2006). Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera: Bruchidae). *J. Insect Physiol.*, 52: 169-178.
- Van Damme, E. J. M., Hao, Q., Charels, D., Barre, A., Rouge, P., Van Leuven, F. & Peumans, W. J. (2000). Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. *Eur. J. Biochem.*, 267: 2746-2759.
- van der Hoorn, R. A. L. & Jones, J. D. G. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 7: 400-407.
- Xavier-Filho, J. (1993). Sementes e suas defesas contra Insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. Organização dos Estados Americanos (OEA). Imprensa Universitária. UFC. 1-9.
- Wan L.; Xia Q.; Qiu X.; Selvaraj G. (2002) Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. *The Plant J.* 30(1), 1-10.
- Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:253-279.
- Wigglesworth, V. B. (1930). The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Q. J. Microsc. Sci.* 73, 593-616.
- Williams, J. O. (1980). Note on bruchidae associated with stored products in Nigeria. *Tropical Grain Legume Bulletin*, 26: 5-10.
- Wiśniewski, K. & Zagdańska, B. (2001). Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J. Exp. Bot.*; 52:1455-1463.
- Yamauchi, D. & Akasofu, H., Minamikawa, T. (1992). Cysteine endopeptidase from *Vigna mungo* – gene structure and expression. *Plant Cell Physiol.*, 33(6):

789-797.

Yunes, A. N. A., Andrade, M. T., Sales, M. P., Morais, R. A., Fernandes, K. V. S., Gomes, V. M. & Xavier-Filho, J. (1998). Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.)]. *J. Sci. Food Agric.* 76: 111-116.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)