**ADAPTAÇÃO DE *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) A INIBIDORES
DE PROTEINASES DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE FUMO.**

Loislene Oliveira Brito

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

**Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.**

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro – 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Brito, Loislene Oliveira
Adaptação de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) a inibidores de proteinases
de plantas TRANSGÊNICAS de fumo / Loislene Oliveira Brito. - - Piracicaba, 2000.
65 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Fungo transgênico 2. Inibidor de proteinase 3. Lagarta-da-maçã-do-algodoeiro
4. Melhoramento genético vegetal 5. Praga agrícola 6. Resistência ao inseto I. Título

CDD 633.71

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Deneval e Evanilda,

À minha irmã Hérica,

OFEREÇO

Aos amigos de todos os momentos...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, professor do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela orientação, amizade e inestimável apoio;

Ao Dr. Stephen Gleddie, Agriculture Canada, pelo fornecimento das sementes de fumo transformadas e o anticorpo anti-PIN II;

Ao Dr. Clarence Ryan, Washington University, pelo fornecimento de inibidor PIN2 purificado;

Ao Prof. Dr. José Roberto Postalí Parra, professor associado do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pela orientação e apoio técnico;

Ao Prof. Dr. Walter Terra, professor do Instituto de Química, pela orientação nos ensaios bioquímicos;

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela oportunidade e apoio técnico recebido para a realização deste projeto;

Aos colegas de trabalho, Alejandro, Ana Lúcia, Cesar, Cristina, Daniela, Danila, Márcia, Patrícia, Sabrina, Reinaldo, pelo convívio fraterno e companherismo;

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP que, de um modo ou outro, contribuíram para a realização deste trabalho;

À Neide Graciano Zério, técnica do Laboratório de Biologia de Insetos, pela inestimável colaboração e pela amizade;

Ao Rafael Colombi, técnico do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pelo apoio e amizade;

Ao Engenheiro Agrônomo Crébio José Ávila, pela ajuda nas análises estatísticas e amizade;

A Mestre Adriana Rios Lopes, pelo inestimável apoio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos do Instituto de Química, que tornaram mais alegre minhas jornadas em São Paulo;

Aos funcionários das Bibliotecas da ESALQ/USP, pelos auxílios prestados;

Aos meus pais e a minha irmã Hérica, pelo estímulo e amizade insubstituíveis;

A todos os meus amigos, que tornaram a minha estadia em Piracicaba muito agradável;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de estudo;

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho;.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Heliothis virescens</i> . (Fabr., 1781).....	3
2.2 Enzimas digestivas.....	4
2.2.1 Classificação.....	4
2.2.2 Serino proteinases.....	5
2.3 Inibidores de proteinase.....	6
2.3.1 Tipos.....	7
2.4 Mecanismos adaptativos.....	10
3 MATERIAL.....	13
3.1 Espécie vegetal.....	13
3.2 Insetos.....	13
4 MÉTODOS.....	14
4.1 Bioensaio.....	14
4.2 Consumo e utilização de alimento.....	15
4.3 Análise estatística geral.....	16
4.4 Ensaios Bioquímicos.....	17
4.4.1 Determinação da concentração protéica.....	17
4.4.2 Preparo de homogeneizado intestinal.....	17
4.4.3 Teste Gus (β - glucuronidase).....	17
4.4.4 Extração de proteína foliar.....	18
4.4.5 Cromatografia para o isolamento das tripsinas.....	18
4.4.6 Superose.....	19
4.4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos para substratos colorimétricos e de fluorescência direta.....	20
4.4.8 Gel de atividade.....	20

4.4.9 Imunodeteccção.....	21
4.4.10 Eletroforese em cilindros de géis em gradiente de concentração de poliacrilamida.....	23
4.4.11 Eletroforese em cilindros de géis de diferentes concentrações de poliacrilamida.....	24
4.4.12 Ensaio das atividades de tripsina, quimotripsina e elastase.....	25
4.4.13 Efeito da benzamidina na atividade enzimática (Ic _{50%}).....	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 Ensaio Biológicos.....	27
5.1.1 Desenvolvimento larval de <i>Heliothis virescens</i> (Fabr., 1781).....	27
5.1.2 Consumo e utilização de alimento.....	29
5.2 Imunodeteccção.....	30
5.3 Ensaio Bioquímicos.....	32
5.3.1 Separação das enzimas por cromatografia.....	32
5.3.2 Cinética enzimática.....	34
5.3.3 Isolamento das diferentes atividades proteolíticas através de eletroforese.....	36
5.3.4 Determinação das endopeptidases através de gel de atividade.....	40
5.3.5 Oligomerização das atividades das tripsinas intestinais.....	42
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ADAPTAÇÃO DE *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) A INIBIDORES DE PROTEINASES DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE FUMO.

Autor: Loislene Oliveira Brito

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

RESUMO

As plantas sintetizam inibidores de proteinases (IPs) como um dos mecanismos de defesa contra o ataque de insetos-praga. Esses inibidores atuam ligando-se às proteinases digestivas localizadas no aparelho digestivo dos insetos fitófagos, impedindo sua atividade proteolítica. Como consequência, ocorre uma redução da disponibilidade de aminoácidos levando a um quadro de deficiência nutricional. Portanto, os IPs são considerados agentes anti-metabólicos. *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) é um inseto-praga de polifagia acentuada, atacando várias culturas de importância econômica. Na tentativa de estudar os efeitos de IPs produzidos pelo fumo e de plantas transgênicas de fumo expressando um IP de batata sobre o desenvolvimento da lagarta desta espécie, foram realizados ensaios biológicos nos quais lagartas foram criadas em dieta artificial (sem inibidor), em plantas de fumo transgênicas (expressando o IP do tipo 2 de batata conhecido como PIN2) e em plantas fumo normais (controle). Os ensaios biológicos mostraram que as lagartas de *H. virescens* apresentaram crescimento e desenvolvimento normais quando em presença do PIN2. A fim de estudar a adaptação das lagartas à

presença dos IPs, foram realizados ensaios bioquímicos envolvendo a caracterização das proteinases intestinais das lagartas. A combinação de técnicas de separação de proteínas pelo peso molecular via eletroforese em gradiente de poliacrilamida (SDS-PAGE) e estudos cinéticos, mostraram a expressão de quatro enzimas do tipo das tripsinas (T1–T4) nos homogeneizados do tubo digestivo de lagartas alimentadas com plantas de fumo (transgênicas ou não) com as seguintes propriedades: T1 ($K_m = 0,27$ mM, $PM = 70$ kDa), T2 ($K_m = 0,35$ mM, $PM = 67$ kDa), T3 ($K_m = 2,4$ mM, $PM = 29$ kDa), T4 ($K_m = 15$ mM, $PM = 17$ kDa). No entanto, lagartas alimentadas em dieta sem inibidor apresentaram apenas uma tripsina majoritária ($K_m = 2,9$ mM, $PM = 29$ kDa), o que está de acordo com o peso molecular das tripsinas normalmente encontradas nas lagartas de lepidópteros. Além das tripsinas, foram detectadas uma quimotripsina (26 kDa) para os três tratamentos e uma elastase (35 kDa) para os homogeneizados de lagartas alimentadas à base de folhas. Eletroforese nativa em diferentes concentrações de géis de poliacrilamida mostrou que T1 e T2 ocorreram em lagartas alimentadas com folhas (selvagens ou transgênicas), ao passo que a filtração em gel, na presença ou ausência de SDS, revelou ainda que T3 e T4 podem originar T1 e T2. Estes resultados sugerem que a presença de IPs nas folhas de fumo permite a expressão de novas moléculas de tripsina com uma superfície hidrofóbica, a qual favorece a formação de oligômeros. Acredita-se que os oligômeros sejam menos afetados pelos IPs por que se ligam melhor ao substrato diminuindo a afinidade dos IPs, ou ainda por hidrolisá-los. O papel da elastase na adaptação é incerto.

ADAPTATION OF *Heliothis virescens* (FABR., 1781) TO PROTEINASE INHIBITORS OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS.

Autor: Loislene Oliveira Brito

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

SUMMARY

Proteinase inhibitor proteins (PIs) are one of the defensive chemicals produced by plants against pests. PIs are polypeptides that are able to bind to insect midgut proteolytic enzymes, rendering them inactive by competitive inhibition. This process leads to a limitation of essential amino acids in protein synthesis, and thus, to reduction in growth and development. Therefore, PIs are known as antinutritional factors. *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) is a polyphagous insect larvae that is considered the key pest of tobacco and other plant groups. Biological assays were performed to elucidate the effects of tobacco PIs and of potato PI expressed in transgenic tobacco plants on tobacco budworm larval growth. *H. virescens* larvae were reared on artificial diet (without inhibitor) or on tobacco leaves (bearing natural inhibitors) and on transgenic tobacco leaves (expressing potato proteinase inhibitor type 2). Biological assays showed normal growth and development of *H. virescens* larvae when they are reared on transgenic tobacco leaves. To study this adaptation, the midgut proteinases of

H. virescens larvae reared on artificial PI free diet and on tobacco leaves were compared by using ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration and polyacrilamide gel electrophoresis under different conditions. SDS polyacrilamide – gradient gel electrophoresis (SDS – PAGE) and kinetic studies showed that leaf –fed larvae have a chymotrypsin (Mr 26,000) an elastase (Mr 35,000) and four trypsins (T1 – T4) with following properties: T1, Km 0.27 mM, Mr 70,000; T2, Km 0.35 mM, Mr 67,000; T3, Km 2.4 mM, Mr 29,000; T4, Km 15 mM, Mr 17,000. Diet –fed larvae have a chymotrypsin (Mr 26,000) and a major trypsin (Km 2.9 mM, Mr 29,000). Native PAGE at different gel concentrations showed that under these conditions only T1 and T2 occur in leaf –fed larvae, whereas gel filtration in the absence and presence of SDS revealed that T3 and T4 can originate T1 and T2. The data suggest that in the presence of PI –containing food *H. virescens* larvae express new trypsin molecules with a hydrophobic surface, which favor the formation of oligomers by hydrophobic bonding. The oligomers are supposed to be less affected by PIs because of tighter binding to the substrate putative decreased affinity for PIs, or by hydrolyzing PIs. The role of elastase in this adaptation is uncertain.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura moderna utiliza uma grande quantidade de produtos químicos com o intuito de diminuir os danos causados por insetos e patógenos. Embora eficaz, este método traz uma série de problemas ao ambiente e ao homem.

Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante aliado às técnicas de transformação genética, torna-se possível a introdução de genes com atividade inseticida em plantas de interesse agrônomo. Na verdade, a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos é uma nova abordagem no controle de insetos que é incorporada no manejo integrado de pragas. Os principais objetivos desta tecnologia estão relacionados à tentativa de diminuir os gastos com agroquímicos, reduzir os danos à natureza e, ao mesmo tempo, aumentar a resistência das plantas a pragas. Inúmeros estudos têm identificado genes de inibidores de proteinases (IPs) em diferentes famílias de plantas e seus efeitos vem sendo testados sobre as enzimas digestivas de insetos fitófagos. Embora o método seja eficiente em algumas situações, nem todos os insetos são suscetíveis aos IPs presentes nas diferentes plantas. Devido a este fato surgiu a necessidade de testes que possam indicar os inibidores mais eficientes para cada praga.

Os IPs são polipeptídeos que possuem a capacidade de se ligar às enzimas proteolíticas dos insetos fitófagos. Os principais IPs conhecidos e caracterizados são os que inibem as enzimas do tipo serino-proteinases. Dentre eles, o inibidor de proteinase do tipo II de batata (PIN2), que apresenta a propriedade de se ligar a duas serino-proteinases, uma tripsina e uma quimotripsina. Estas enzimas são responsáveis pela maior parte da atividade proteolítica encontrada no tubo digestivo de insetos da ordem lepidoptera.

O presente trabalho teve como objetivo testar o efeito de plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana tabacum*) expressando IP do tipo II de batata sobre a lagarta da maçã do algodoeiro *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera: Noctuidae).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781)

Insetos do gênero *Heliothis* são grandes causadores de danos na agricultura; das 80 espécies conhecidas 3 são as principais responsáveis por danos: *H. armigera* (Hardwick), *H. zea* (Boddie) e *H. virescens* (Fitt, 1989).

H. virescens (Lepidoptera: Noctuidae) conhecida como “lagarta da maçã do algodoeiro” é uma espécie- praga que ocorre nas Américas do Norte e do Sul com populações freqüentes em áreas entre as latitudes 40⁰N e 40⁰S. Esta praga ataca culturas economicamente importantes como: soja, algodoeiro, milho, feijoeiro, cana-de-açúcar, sorgo, lentilha, pepino, pimentão, além de plantas ornamentais e hortaliças (Barber, 1937; Hambleton, 1944; Metcalf et al., 1962; Kincade et al., 1967; Kogan et al., 1978; Fitt, 1989). Segundo Metcalf et al. (1962), a polifagia natural da espécie dificulta a determinação das culturas que ataca. Além da polifagia, Fitt (1989) atribui mais três características que tornam este gênero uma praga importante: alta mobilidade, alta fecundidade e uma diapausa facultativa.

H. virescens tornou-se praga de importância econômica a partir de 1960, por ter desenvolvido resistência a vários inseticidas (Bottrell & Adkisson, 1977; Parencia, 1978). Atualmente há registro de que essa praga possui resistência a todos os inseticidas convencionais registrados (Martin et al., 1995), inclusive as proteínas CryA(b) e CryA(c) do *Bacillus thuringiensis* (Tabashnik, 1994).

2.2 Enzimas digestivas

2.2.1 Classificação

As enzimas digestivas dos insetos são conhecidas como hidrolases e classificadas de acordo com o substrato que degradam: corpos protéicos são desmembrados por proteases e a total degradação dos carboidratos é gerada pela ação das carbohidrases.

As proteases (peptídeo-hidrolases) incluem as proteinases (endopeptidases) e as exopeptidases. Proteinases são divididas em sub-classes com base no mecanismo catalítico: serino-, cisteíno-, aspartato- e metalo-proteinases. Por sua vez, as exopeptidases incluem enzimas que hidrolisam aminoácidos da extremidade N-terminal (aminopeptidases) ou da extremidade C-terminal (carboxipeptidases) da cadeia polipeptídica; ocorrem ainda enzimas que são específicas para desmembrar dipeptídeos, como as dipeptídeo-hidrolases (Terra & Ferreira, 1994).

2.2.2 Serino-proteinases

As enzimas do tipo serino-proteinases são assim chamadas por apresentarem um aminoácido serina no seu sítio ativo. Esse aminoácido apresenta propriedades especiais que permitem a ligação ao substrato e a catálise do mesmo.

Dentre as serino-proteinases destacam-se as tripsinas e quimotripsinas que são importantes enzimas digestivas presentes praticamente em todos os organismos vivos (Geoffroy et al., 1990). Para os insetos elas são responsáveis por cerca de 95% da proteólise (Johnston, 1995).

As enzimas do tipo tripsina clivam cadeias protéicas, preferencialmente, na região carboxi-terminal de aminoácidos básicos como lisina ou arginina. Essas enzimas foram caracterizadas em diversas ordens de insetos de interesse econômico como Coleoptera, Díptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Thysanura (Terra & Ferreira, 1994).

As quimotripsinas são enzimas que clivam cadeias protéicas, preferencialmente, em aminoácidos aromáticos, na região carboxi-terminal. As quimotripsinas, assim como as tripsinas, apresentam uma taxa similar de distribuição entre os insetos. Também apresentam algumas similaridades com as quimotripsinas dos vertebrados (Jany et al., 1978 e 1983; Ward, 1975).

Um terceiro tipo enzimático da família das serino-proteinases são as elastases. Com a caracterização enzimática do trato digestivo de *H. virescens*, Johnston et al. (1995) demonstraram três tipos de atividades protéicas. Os dois tipos de maior atividade eram de enzimas como as tripsinas e quimotripsinas, enquanto que o terceiro

tipo de proteinase encontrada, com menor nível de atividade, era semelhante às elastases. Acredita-se que esses três tipos enzimáticos evoluíram de um ancestral comum e, por esse motivo, sejam estruturalmente semelhantes e apresentem o mesmo mecanismo de ação, diferindo pronunciadamente na especificidade ao substrato. *Helicoverpa armigera* (Hardwick) também apresenta como principais atividades proteolíticas, tripsinas e quimotripsinas (Christeller et al., 1992, Johnston et al., 1991 e Bown et al., 1997)

Os dois principais tipos de enzimas do ventrículo médio da lagarta *H. virescens* trabalham em um pH ótimo alcalino, em torno de 10. Vários estudos identificaram este pH para serino-proteinases de outros insetos da ordem Lepidoptera (Ward, 1995; Pritchett et al., 1981; Johnston et al., 1991; Purcell et al., 1992).

A especificidade das tripsinas de insetos contrastam, em algumas características, com as mesmas dos vertebrados (Lemos & Terra 1992; Johnston et al., 1991, 1995). As tripsinas dos insetos não necessitam da presença de íons cálcio para serem ativadas ou estabilizadas, ao contrário dos vertebrados. Purcell et al. (1992) destacaram que as tripsinas dos insetos são sensíveis aos inibidores naturais, enquanto as tripsinas dos vertebrados apresentam menos sensibilidade aos inibidores.

2.3 Inibidores de proteinase

As plantas são capazes de reagir contra uma série de condições estressantes via alteração na expressão de genes capazes de adaptá-las à nova situação. Basicamente, este processo envolve o acúmulo de uma série de proteínas de defesa que incluem os

inibidores de proteinases (IPs) (Balandin et al., 1995). Entretanto, os IPs podem também apresentar um papel fisiológico na forma de proteína de reserva das sementes (Xavier-Filho, 1992). Os IPs são proteínas ou polipeptídeos que ocorrem numa ampla variedade de plantas e apresentam a propriedade de inibir proteinases digestivas encontradas em insetos fitófagos (Pearce et al., 1982; Broadway et al., 1986; Broadway & Duffey, 1986; Hilder et al., 1987; Geoffroy et al., 1990; Broadway, 1993; Gatehouse et al., 1993). O acúmulo de IPs nas plantas é regulado por um pequeno peptídeo de 18 amino ácidos conhecido como sistemina, que é capaz de induzir a síntese de IPs a partir de um ferimento na planta (Pearce et al., 1991). A sistemina é liberada no local do ferimento sendo transportada ao longo da planta, ativando a expressão sistêmica dos IPs em toda a planta (Bishop et al., 1984). Portanto, estas proteínas inibem funções catalíticas de enzimas digestivas do trato intestinal de insetos fitófagos (Richardson, 1981), promovendo uma espécie de resistência ao ataque dos insetos

2.3.1 Tipos

Os inibidores de proteinase melhor caracterizados são os inibidores das serino-proteinases. Eles são encontrados em altas concentrações em sementes de leguminosas e em quantidades menores em cereais e tubérculos (Richardson, 1991). Espécies nativas brasileiras têm sido bastante estudadas e suas estruturas determinadas (Oliva et al., 1987; Souza et al., 1995; Tanaka et al., 1997). Um número razoável de inibidores das cisteíno-proteinases também são conhecidos (Abe et al., 1987; 1992), embora poucos foram identificados para aspartato- e metalo-proteinases (Ryan, 1990; Bode & Huber, 1992).

Os inibidores de serino proteinase são agrupados em 16 famílias, baseado na similaridade de sua seqüência e no mecanismo de ligação à proteína. São inibidores competitivos e, aparentemente, todos inibem proteinases com um mecanismo similar ao modelo antígeno-anticorpo (Laskowski & Kato, 1980; Ryan, 1990).

Plantas de batata e tomate apresentam duas pequenas famílias de genes que codificam dois inibidores de serino-proteinases, chamados inibidores do tipo I e II. O inibidor do tipo I inibe proteinases do tipo quimotripsina, enquanto o inibidor do tipo II possui dois sítios de inibição, um para tripsina e um outro para quimotripsina (Bryant et al., 1976; Plunkett et al., 1982; Atkinson et al., 1993). Nessas plantas, os inibidores são sintetizados nas folhas em resposta à indução ao ataque de insetos (ferimento) ou outro mecanismo de estresse (Green & Ryan, 1972; Johnson et al., 1989).

O inibidor do tipo II de batata é produto do gene *pin2*. Peña-Cortes et al. (1995) mostraram que fragmentos da parede celular, fitohormônios como ABA (ácido abscísico) e JA (ácido jasmônico), têm a propriedade de ativar a expressão deste gene. Balandin et al. (1995) demonstraram que a irradiação UV e etileno também são capazes de ativar o gene *pin2*. Resultados semelhantes foram observados por Brown et al. (1985), que demonstraram em alfafa, que os genes codificadores de inibidores de proteinase também eram ativados por lesão mecânica. Após a ativação do gene *pin2*, o inibidor é acumulado de forma sistêmica em toda a planta. Aparentemente, esta resposta sistêmica ocorre em diversas plantas como tomateiro (Plunkett et al., 1982), batata (Pearce et al., 1982) e fumo (Balandin et al., 1995).

Keil et al. (1986) demonstraram que o gene *pin2* produz um RNA mensageiro interrompido por um intron de 117 nucleotídeos. Provavelmente, esse intron cria um sinal peptídico usado para importação da proteína para dentro do retículo endoplasmático, do qual o inibidor de proteinase é finalmente encaminhado para o vacúolo. Após modificação pós-transcricional, o inibidor de proteinase do tipo II de batata apresenta 154 aminoácidos.

Wolfson and Murdock (1995) observaram que os inibidores de proteinase contra enzimas digestivas de insetos podem diminuir o desenvolvimento das lagartas sem causar mortalidade direta. Os mesmos autores demonstraram, em *Epilachna varivestis* (Mulsant) que a ingestão de inibidor aumenta o período de pré-oviposição, promove maior intervalo entre posturas, diminui o número total de ovos depositados e alonga o período de desenvolvimento larval.

Experimentos com *Manduca sexta* (Linnaeus) em plantas transgênicas de fumo mostraram que o inibidor II de batata pode reduzir significativamente o crescimento e o desenvolvimento do inseto. O prolongado período larval expõe os insetos por maior tempo aos seus parasitóides, predadores e patógenos naturais (Johnson et al., 1989). E ainda, lagartas alimentadas com plantas transgênicas de algodoeiro, expressando inibidor de proteinase, levaram a uma menor emergência (Thomas et al., 1995). Duan et al. (1996), observaram que plantas transgênicas de arroz contendo o gene *pin2* de batata, apresentavam maior resistência à *Sesamia inferens* (Walker).

2.4 Mecanismos Adaptativos

Inúmeros trabalhos na literatura têm mostrado a utilização de inibidores de proteinase como uma estratégia eficiente no controle de pragas (Duan et al., 1996; Gatehouse et al., 1997; Hilder et al., 1987; McManus et al., 1994; Xu et al., 1996, entre outros). Entretanto, até o presente momento foram identificados três mecanismos capazes de proporcionar a adaptação dos insetos aos inibidores de suas plantas hospedeiras. O primeiro mecanismo consiste em um aumento da expressão da enzima inibida. Broadway e Duffey (1986) mostraram que não há redução da atividade proteolítica das enzimas digestivas de *Spodoptera exigua* (Hübner) e *Heliothis zea* (Buddie), o que ocorre é a super produção da enzima sensível ao inibidor de proteinase. Resultados semelhantes foram obtidos por Burgess et al. (1991), Larocque & Houseman (1990), McManus & Burgess, (1995). Para *Lacanobia oleracea* (Linnaeus), Gatehouse et al. (1999), mostraram que a atividade proteolítica do tubo digestivo da lagarta era aumentada de até quatro vezes quando em presença de SKTI (inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz).

O segundo mecanismo utilizado pelos insetos é baseado na síntese e/ou secreção de proteinases menos sensíveis ao inibidor. Bolter & Jongsma (1995) observaram que *Leptinotarsa decemlineata* (Say) quando criadas em dieta à base de plantas de batata, apresentavam uma atividade proteolítica reduzida em 42%. Entretanto, os autores observaram o aumento de uma atividade trípica insensível ao inibidor de cerca de duas vezes quando comparadas aos insetos da testemunha. O mesmo resultado foi obtido por

Jongsma et al. (1995) e Broadway (1996) trabalhando com *Spodoptera exigua* (Hübner) e *Heliothis zea* (Boddier) alimentadas com inibidor do tipo II de batata. Os autores observaram que as lagartas foram capazes de aumentar de 2,5 a 3 vezes a produção de uma proteinase pouco sensível ao inibidor, numa interessante forma de adaptação. Mais recentemente, Bown et al. (1997), verificaram que *Helicoverpa armigera* (Hardwick) apresentava variantes de enzimas digestivas pertencentes ao grupo das serino-proteinases. Resultados semelhantes foram obtidos por Gatehouse e colaboradores (1997) que mostraram que *H. armigera* (Hardwick) apresenta 18 genes que codificam para tripsinas e 14 que codificam para quimotripsinas. O nível das proteinases do tipo das quimotripsinas foi significativamente aumentado enquanto que o nível das tripsinas não foi alterado devido à presença de inibidores. Broadway (1995) demonstrou que a exposição crônica dos insetos a inibidores de proteinases promove a produção de enzimas digestivas parcialmente resistentes. O mecanismo regulatório responsável pela secreção de diferentes enzimas não é conhecido, e pode ser um conjunto de fatores indutores, cada um responsável pela produção de uma enzima ou de um grupo de enzimas.

O terceiro mecanismo adaptativo consiste na síntese de proteinases que promovem a degradação dos inibidores das plantas no lúmen intestinal dos insetos. Michaud (1997) mostrou a degradação proteolítica de orizacistatina II por proteinases de pragas de cotilédones (*Otiorynchus sulcatus*, Fabricius). Giri et al. (1998) observaram que *H. armigera* (Hardwick), além de ser capaz de produzir enzimas insensíveis ao inibidor, sintetizou proteinases capazes de degradar os inibidores de sementes de *Cicer*

arietinum. O mesmo mecanismo foi encontrado por Girard et al. (1998) no trato digestivo de *Phaedon cochleariae* (Fabr., 1792) (coleoptera).

Apesar dos inibidores não apresentarem a mesma eficiência para todos os insetos, Baldwin & Preston (1999) propõem que os inibidores são eficientes e participam da defesa direta das plantas, mas sua eficiência depende de um conjunto de fatores abióticos e de outros componentes de defesa secundários (produção de metabólitos), além da presença de inimigos naturais e patógenos. Na natureza, esse conjunto de fatores completaria a tolerância das plantas aos insetos.

3 MATERIAL

3.1 Espécie vegetal

Sementes de fumo (*Nicotiana tabacum*) variedade Delgold selvagem e transformada com o plasmídeo pBIFV14 (S. Gleddie, comunicação pessoal), contendo o gene *pin2* de batata, sob o controle do promotor induzível *vspA* (vegetative storage Promoter A) de soja, foram fornecidos pelo Dr. Steve Gleddie (Agriculture Canada, Ottawa, Canada).

As sementes foram germinadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) foi suplementado com 3% (p/v) de sacarose e 0,8% (p/v) de ágar, e com Kanamicina (0,01% p/v), no caso das sementes transgênicas. Após algumas semanas, as plantas foram transferidas para vasos em casa de vegetação e submetidas a uma fotofase de 14 horas. Adubações periódicas foram efetuadas.

3.2 Insetos

As lagartas de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) foram fornecidas da "criação estoque" do setor de Biologia do Departamento de Entomologia Fitopatologia, Zoologia

Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - (ESALQ), da Universidade de São Paulo - (USP). Foram criadas nas seguintes dietas: discos foliares de *Nicotiana tabacum* normal; discos foliares de *N. tabacum* transgênico e a seguinte dieta artificial (Parra, 1998):

Ágar	25,5 g
Feijão	165,0 g
Germe de trigo	79,2 g
Levedura de cerveja	50,5 g
Ácido ascórbico	5,1 g
Ácido sórbico	1,65 g
Metil p-hidroxibenzoato (nipagin)	3,15 g
Água	1195 ml
Formaldeído 10%	12,5 ml

* Quantidade suficiente para 100 tubos de dieta.

4 MÉTODOS

4.1 Bioensaio

As lagartas foram criadas em dieta artificial, como proposto por Parra (1996), em tubos de vidro de fundo chato de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, fechados com algodão hidrófugo e mantidos à 25 ± 2 °C, UR $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas. As lagartas, no segundo ínstar de desenvolvimento, foram transferidas para placas de Petri e alimentadas com discos foliares de fumo (normal e transgênico), trocados diariamente.

Na fase de pré-pupa as lagartas foram transferidas para placas contendo areia esterilizada, até transformarem-se em pupas.

As pupas foram separadas por sexo (Butt & Cantu, 1962) e individualizadas em copos descartáveis (40 ml), mantidos sobre bandejas forradas com papel de filtro, o qual foi umedecido diariamente. As pupas foram aí mantidas até a emergência.

Para os dois tratamentos (folhas normais e folhas transgênicas) foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: duração e viabilidade da fase larval e pupal, peso de pupa (macho e fêmea) com 24 horas de idade e ganho de peso das lagartas. Cada tratamento foi feito com 150 repetições.

4.2 Consumo e utilização de alimento

Lagartas de *H. virescens* no 6º instar foram colocadas em placas de Petri (tampa com tampa) fechandas com fita adesiva. A umidade foi mantida através de papel de filtro umedecido. Os discos foliares foram oferecidos em porções simétricas, usando-se uma porção como alimento e outra como alíquota. Esta foi mantida a $25 \pm 2^{\circ}$ C, UR $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas. O peso fresco da lagarta e dos discos foliares foram avaliados antes e depois do consumo de alimento. Após 24h também as fezes foram pesadas (Waldbauer, 1968). A área foliar consumida foi pesada e comparada com a área foliar total inicial.

Com relação aos parâmetros nutricionais, foram determinados os seguintes índices, após 24h de alimentação em plantas de fumo normais e transgênicas (Panizzi & Parra, 1991).

a) Eficiência de Conversão do alimento ingerido (%): $ECI = \frac{B}{I} \times 100$

b) Eficiência de conversão do alimento digerido (%): $ECD = \frac{B}{I.F} \times 100$

c) Digestibilidade aproximada (%): $AD = \frac{I - F}{I} \times 100$

d) Custo Metabólico (%) = 100 - ECD

onde,

T- tempo de duração do período de alimentação;

I- alimento consumido;

F- alimento não digerido + produto de excreção;

I-F- alimento assimilado durante T;

B- peso médio das lagartas durante T

4.3 Análise Estatística Geral

Os dados obtidos com as diferentes etapas do bioensaio foram submetidos ao teste de Tukey ($p 0,05$). O consumo de área foliar e ganho de peso foram submetidos ao teste t ($p 0,05$).

4.4 Ensaios bioquímicos

4.4.1 Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração de proteína das amostras foi feita pelo método Bradford (1976) usando a albumina bovina (BSA) como padrão.

4.4.2 Preparo de homogeneizado intestinal

Lagartas de *H. virescens* no 5º ou 6º ínstar de desenvolvimento foram anestesiadas em gelo para extração de membrana peritrófica do ventrículo intestinal. As membranas foram homogeneizadas em potter Elvegjen com água destilada na proporção de 5 lagartas/ml. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à uma rotação de 20.000g por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante foi coletado e usado em ensaios bioquímicos (Ferreira et al., 1994a e b).

4.4.3 Teste Gus (β -glucuronidase)

As amostras de tecido vegetal (fumo transgênico e fumo normal) foram colocadas em contato com X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico) (1mM) a 37° C por 24 horas. Após este período, o material foi fixado em uma solução de ácido acético 10% com fixador Carnoy (1: 3).

4.4.4 Extração de proteína foliar

Com 24h de antecedência, as plantas de fumo foram lesionadas para ocorrer a indução e expressão do inibidor de proteinase PIN2. A obtenção do extrato foliar (normal e transgênico) foi feita de acordo com Broadway (1995). As folhas foram pesadas e logo após enroladas em papel alumínio, mergulhadas em nitrogênio líquido e maceradas em almofariz. O tampão de extração utilizado foi Tris-Cl pH 7,0+ 0,1% de ácido ascórbico. O material foi filtrado em gaze e centrifugado por 15 minutos à 3500g e 4°C. Ao sobrenadante foi acrescentado sulfato de amônio à 70% de saturação, sendo o extrato novamente centrifugado por 30 minutos à 4600g e 4°C. O “pellet” foi ressuspensionado em água Milli-Q.

4.4.5 Cromatografia para o isolamento das tripsinas

As tripsinas de *H. virescens* provenientes das três dietas, foram isoladas utilizando-se colunas de cromatografia de troca catiônica (High S), troca aniônica (High Q); cromatografia hidrofóbica (Metil – HIC) no sistema de baixa pressão (Econo System – BioRad). Para as colunas de troca catiônica, nos dois sistemas foi utilizado tampão acetato 20mM, pH 5,0, sendo que a eluição foi feita com tampão acetato 20 mM, pH 5,0, NaCl 1,0 M. Foi aplicado e eluído, no mesmo tampão anteriormente referido, 0,5 mg de proteína, com um gradiente de tampão acetato de 1,0 - 0 M. Para as colunas de troca aniônica foram utilizados os seguintes tampões: etanolamina 20 mM pH 9,0 e (etanolamina 20 mM pH 9,5, benzamidina 50 mM); (etanolamina 20 mM pH 9,0, NaCl 1,0 M, benzamidina 50 mM), (Tris – HCl 20 mM pH 8,0) – (Tris – HCl 20 mM pH 8,0,

NaCl 1,0 M). 0,5 mg de proteína, foi aplicado e eluído em tampão etanolamina contendo 1,0 M de NaCl. Para a coluna hidrofóbica foi utilizado tampão fosfato 50 mM pH 6,8, sulfato de amônio 1,7 M e para a eluição tampão fosfato 50 mM pH 6,8. 0,5 mg de proteína no mesmo tampão foi aplicado na coluna e eluídos com um gradiente de sulfato de amônio de 1,7 - 0 M

4.4.6 Superose

Para a definição dos padrões de migração e determinação dos pesos moleculares das diferentes formas de atividade de tripsina em *H. virescens* alimentadas em dieta artificial ou em folhas de fumo selvagem, foram realizadas cromatografias em coluna de filtração em gel Superose-12 em sistema de alta pressão (FPLC – Pharmacia). Foram utilizadas diferentes condições (presença de detergente e alta força iônica) para verificação de formação ou dissociação de possíveis oligômeros. Para isso, as cromatografias foram realizadas em: tampão Tris-HCl 20mM pH 8,5 NaCl 1,0 M (condição de alta força iônica), Tris-HCl 20mM pH 8,5 SDS 0,5% e tampão Tris-HCl 20mM pH 8,5 como condição controle. Foram aplicados os sobrenadantes de homogeneizados intestinais de lagartas *H. virescens* provenientes das duas diferentes dietas, filtrados em membranas Millipore de pvdf 0,45µm de poro. Os eluídos das cromatografias foram ensaiados para verificação da atividade de tripsina.

4.4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos para substratos colorimétricos e de fluorescência direta

Estudos do efeito da concentração de BApNA (N-benzoil-DL-arginine *p*-nitroanilide) (colorimétrico) e de CBZPAMCA (N- α -carbobenzoxy-phenilalanina-arginina-7amido-4-metilcumarina) (fluorescente) na atividade das tripsinas foram realizados utilizando-se 14 diferentes concentrações numa faixa de 1 a 100 μ M. As incubações com os homogeneizados intestinais de *H. virescens* (das três diferentes dietas) ou os isolados de tripsina (homogeneizados intestinais de *H. virescens* criadas em dieta artificial e em folhas de fumo normal, separados em cilindro) foram mantidos à 30°C. As taxas de reação foram calculadas usando o programa Enzfitter (Elsevier Biosoft) para obtenção de valores da constante de Michaelis-Menten, K_m e V_{max} .

4.4.8 Gel de atividade

Optou-se por utilizar um gel de gradiente de acrilamida para melhor separação das proteínas. Numa cuba de eletroforese vertical foi preparado o gel de acrilamida num gradiente de 7,5% (625 μ l de solução B: 1,5 M tris HCl pH 8,8; 25 μ l de SDS 10%; 12,5 μ l de persulfato de amônio 100 mg/ml; 1,25 μ l de TEMED; 625 μ l de solução A: acrilamida/bis (30% T, 2.67% C); 1212 μ l de água) a 12% (625 ml de solução B; 25 ml de SDS 10%; 12,5 μ l de persulfato de amônio 100 mg/ml; 1,25 μ l de TEMED; 1000 μ l de solução A e 840 μ l de água). Após o endurecimento acrescentou-se um gel de empilhamento (2,5 ml de solução A; 2,5 ml de solução C: Tris HCl 0,5 M, pH 6,8: 100 μ l de SDS 10%; 50 μ l de persulfato de amônio 100 mg/ml; 10 μ l TEMED e 6,1 ml de

água) (Laemmli, 1970). As amostras (homogeneizados intestinais) não foram fervidas e a elas foi acrescentado o tampão de amostra (4,4 ml de água; 1,0 ml de solução C; 0,8 ml de glicerol; 1,6 ml de SDS 10% e 0,2 ml de bromofenol 0,05%). A cuba com o gel foi preenchida com o tampão de corrida (Tris, Glicina e SDS). A corrida foi feita em geladeira (4°C) à 100 volts, por duas horas. Após a corrida, o gel de empilhamento foi removido e foi retirado das placas de vidro e lavado por 10 minutos com Triton X-100 (2,5% v/v) em tampão Tris HCl 100 mM pH 8,5, sob agitação. Após a lavagem, foi preparado o “sanduíche” com o gel de gelatina (7,2 ml de água; 4,7 ml de solução B; 2,5 ml de solução A; 1,9 ml de gelatina 1%; 70 µl de persulfato de amônio 100 mg/ml; 11,2 µl de TEMED e 200 µl de SDS 10%). O gel de acrilamida foi colocado sobre o gel de gelatina numa cuba com algodão umedecido com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 e mantido a 30° C por duas horas, conforme descrito por Jordão et al. (1996). Transcorrido esse tempo, o gel de gelatina foi transferido para uma solução de coloração 0,1% Comassie Blue R-250 em água-metanol-ácido acético (5:5:2, v/v/v), previamente filtrada em papel de filtro, por um período de seis horas. Em seguida, o gel foi descolorido em uma solução de água-metanol-ácido acético (30:7:63, v/v/v). Foram realizadas várias lavagens até a visualização das bandas

4.4.9 Imunodeteção

Migração: preparou-se um gel de acrilamida 14% (8,4 ml de acrilamida/bisacrilamida (30% / 0,8%); 4,5 ml de tampão de corrida; 5,0 ml de água; 100 µl de persulfato de

amônio e 9 μ l de TEMED), numa cuba de eletroforese vertical. O gel de empilhamento foi adicionado logo após a polimerização do gel de corrida. O gel de empilhamento foi composto de: 1,2 ml de acrilamida/bisacrilamida; 2,0 ml de tampão (Tris 0,5M; EDTA 8 mM; SDS 0,4% e água destilada, pH 6,8); 4,7 ml de água; 75 μ l de persulfato de amônio e 7,5 μ l de TEMED. Como controle, foi utilizado o inibidor PIN2 purificado. As amostras foram misturadas com meio de solubilização (15 mg de DTT e 1 ml de água), atingindo 10% do volume da amostra. As amostras foram colocadas em banho à 55° C por 15 minutos antes de carregar o gel. A cuba com o gel foi preenchida com tampão de migração (Tris 1,5 M; EDTA 8 mM; SDS 0,4%; água destilada, pH 8,8) e recebeu uma voltagem de 100V por 2 horas. Após a migração das proteínas o gel foi transferido para o aparato de transferência formando um “sanduíche”: papel de filtro, gel, membrana de transferência, papel de filtro. Esse “sanduíche” foi colocado na cuba de transferência preenchida com tampão (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% e água destilada), e submetido às seguintes condições: 12 minutos – 75 mA; 15 minutos – 175 mA; 25 minutos – 400 mA; 10 minutos – 450 mA.

Marcação: Após transferência, a membrana foi saturada com uma solução de leite em pó desnatado, TWEEN 20 e TBS (Tris/HCl 2 mM, NaCl 8 mM, pH 7,6 e água destilada), por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada (3 x 10 min) com TBS-T (TWEEN 20 e TBS). A membrana foi incubada com o anticorpo primário (1:2000) por 1 hora. Logo após, repetiram-se as 3 lavagens com TBS-T por 10 minutos cada. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário de coelho, proveniente do kit de detecção ECL (Amersham Life Sciences), numa concentração (1:3000), por 1 hora. Novamente a membrana foi lavada com TBS-T, 3 vezes por 10 minutos cada.

Detecção: Logo após a membrana foi colocada em contacto com 10 ml de uma solução de BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) (Sigma) para detecção da atividade da fosfatase alcalina.

4.4.10 Eletroforese em cilindros de géis em gradiente de concentração de poliacrilamida

Amostras do homogeneizado de *H. virescens* (dieta artificial) foram combinadas em uma proporção 1:9 ao tampão de amostra contendo 1,0 ml de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 1,6 ml SDS 10%, 0,2 ml bromofenol, 0,05% (p/v), 0,8 ml glicerol e 4,4 ml de água bidestilada. As demais preparações foram diluídas no mesmo tampão de amostra em uma proporção de 1:1 e 1:4, nos casos de *H. virescens* (folhas de fumo normal) e *H. virescens* (folhas de fumo transgênico), respectivamente.

Estas amostras foram aplicadas em cilindros de vidro de 5 mm i. d. e 100 mm de comprimento, contendo géis em gradiente de 7,5% a 12% de poliacrilamida de 0,5 cm de diâmetro por 9,0 cm de comprimento. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 100 V, à 4°C e a migração foi acompanhada pela formação de uma linha de frente devido à presença de azul de bromofenol no tampão de amostra. Após o processo eletroforético, os cilindros de gel foram lavados em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 contendo Triton X-100 2,5 % (v/v) para retirada do SDS presente no gel, por 30 minutos, sendo submetidos a três trocas de tampão durante o processo de lavagem.

Os géis foram fracionados com a utilização de um fracionador de géis de poliacrilamida (Autogeldivider-Savant Instruments Inc) em tampão Tris-HCl 0,1 M Triton X-100 2,5 % (v/v). Frações de aproximadamente 2 mm de gel foram coletadas em

coletor (Pharmacia LKB- Frac 200) e as frações permaneceram à 4°C durante 12 horas para eluição.

Alíquotas de cada uma das frações obtidas foram utilizadas para a realização das determinações de atividade enzimática.

4.4.11 Eletroforese em cilindros de géis de diferentes concentrações de poliacrilamida

Amostras do homogeneizado de *H. virescens* (dieta artificial, folhas de fumo normal e transgênico) foram aplicadas a cilindros de géis de poliacrilamida em diferentes concentrações (5,5; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 %): 5,5 % de acrilamida (2 ml de solução A (Tris 0,3 M, pH 8,9); 0,74 ml de HS (acrilamida 60 % + bisacrilamida 10 %); 0,66 ml água; 0,6 ml de Temed (46 µl em 10ml de água); 4 ml de persulfato de amônio (14 mg em 10 ml de água), 6% (2 ml de solução A; 0,8 ml de HS; 0,6 ml água; 0,6 ml de Temed; 4 ml de persulfato de amônio), 7% (2 ml de solução A; 0,94 ml de HS; 0,46 água ml; 0,6 ml de Temed; 4 ml de persulfato de amônio), 8 % (2 ml de solução A; 1,07 ml de HS; 0,33 ml água; 0,6 ml de Temed; 4 ml de persulfato de amônio), e 9% (2 ml de solução A; 1,2 ml de HS; 0,2 ml água; 0,6 ml de Temed; 4 ml de persulfato de amônio). No gel de empilhamento, para cada cilindro foi usado uma parte de solução B (Tris 50mM pH 6,7); uma parte de solução D (20% acrilamida + 5% de bisacrilamida); uma parte de solução E (4mg de riboflavina/ 100 ml de água); uma parte de Temed e 4 partes de Glicerol 40 % (Hendrick & Smith, 1968). Cada cilindro apresenta 0,5 cm de diâmetro por 9,0 cm de comprimento. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 100V, à 4°C e a migração foi acompanhada pela formação de uma linha de frente devido `a presença

de 0,5 ml de azul de bromofenol (0,005 %) no tampão de migração (Tris-Glicina 0,2 M, pH 8,3) presente na cuba.

Os géis foram fracionados com a utilização de um fracionador de géis de poliacrilamida (Autogeldivider-Savant Instruments Inc) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5. Frações de aproximadamente 2 mm de gel foram coletadas. Aliquotas de cada uma das frações obtidas foram utilizadas para a realização das determinações de atividade de tripsina.

4.4.12 Ensaio das atividades de tripsina, quimotripsina e elastase

A atividade das tripsinas foi determinada utilizando-se os métodos colorimétrico e fluorimétrico. No método colorimétrico utilizou-se 0,83 mM de BapNa (Erlanger et al., 1961); no método fluorimétrico utilizou-se CBZPAMCA (N- α -carbobenzoxifenilalanina- arginina-7amido-4metil-coumarin – Sigma) em Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 (excitação a 380nm e leitura da fluorescência 460nm). Para determinação da atividade enzimática das quimotripsinas, utilizou-se como substrato fluorescente SAAPMCA (N- α -Succinyl-L-alanina-alanina-fenilalanina-7-amido-4metil-coumarin – Sigma). Para os ensaios com enzimas do tipo elastase, utilizou-se AcAAApNa (N- α -Acetyl-alanina-alanina-alanina-*p*-nitroanilida– Sigma). Todos os ensaios foram mantidos a 30°C em pH 8,5 e as reações foram interrompidas com 200 μ l de ácido acético 30%. A produção de pNa foi medida a 410 nm (em espectrofotômetro) e a produção de MCA foi medida

usando comprimento de onda de 380nm para excitação e 460nm para emissão (em fluorímetro) (Alves et al., 1996).

4.4.13 Efeito da benzamidina na atividade enzimática ($I_{c50\%}$)

O efeito da inibição por benzamidina foi medido utilizando-se ensaios com uma simples concentração de substrato e com uma variação de 0 a 4.2 mM de inibidor para determinar os valores de $I_{c50\%}$.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios Biológicos

5.1.1 Desenvolvimento larval de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781)

Não houve diferença estatística entre o período larval de *H. virescens* alimentadas com folhas de fumo normal e transgênico de fumo. Nos dois tratamentos, as durações das fases larval e pupal, foram muito próximas (Tabela 1), a mortalidade larval também foi semelhante nas duas condições (a cada 100 lagartas, 60 chegaram à fase de pupa - 40% de mortalidade).

Também o peso de pupas que deram origem a machos, originárias de lagartas alimentadas com dieta à base de plantas transgênicas e normais não mostrou variação. Entretanto, o peso das pupas que deram origem a fêmeas, oriundas das lagartas alimentadas com plantas transgênicas foi significativamente inferior àsquelas obtidas a partir de dietas à base de plantas normais (Tukey 5%) (Tabela 1).

Também a mortalidade pupal foi significativamente maior nos insetos alimentados com plantas transgênicas (18,2 %) em relação àsquelas alimentadas com plantas normais (9,6%) (Figura 1).

Tabela 1: Duração dos estágios larval e pupal (machos e fêmeas), peso de pupas (machos e fêmeas) de *Heliothis virescens* criadas em folhas de fumo transgênico e normal. Temperatura: 25 ± 2 °C; UR: $60 \pm 10\%$; fotofase 14 horas.

Tratamentos	Duração das fases (dias) ¹		Peso de pupas (mg) ¹	
	Larval	pupal	Machos	Fêmeas
Normal	$22,13 \pm 0,215$ a	$19,86 \pm 0,431$ a	$211 \pm 0,007$ a	$213 \pm 0,005$ a
Transgênico	$21,60 \pm 0,214$ a	$20,50 \pm 0,376$ a	$196 \pm 0,009$ a	$197 \pm 0,005$ b

¹ Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 1: Mortalidade de pupas (%) de *H. virescens* provenientes de tratamentos com plantas de fumo transgênico e normal (25 ± 2 °C, UR $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas).

5.1.2 Consumo e utilização de alimentos

Não houve diferença entre o peso de folha consumida por *H. virescens* nos dois tratamentos, após 24 horas de consumo. As lagartas alimentadas com folhas de fumo normal consumiram em média $362 \pm 0,028$ da área foliar e as lagartas alimentadas com fumo transgênico consumiram $47 \pm 0,021$ (Figura 2).

As lagartas de *H. virescens* alimentadas com plantas de fumo transgênico e normal ganharam peso igualmente nos dois tratamentos estudados (Figura 2).

O consumo e utilização de alimento foram semelhantes nos dois tratamentos, não havendo influência das plantas transgênicas sobre a digestibilidade aproximada, eficiência de conversão e nem sobre o metabolismo (Tabela 2).

Figura 2: Peso de folha de fumo (mg) consumida e ganho de peso, de lagartas de *Heliothis virescens* alimentadas (24 horas) com folhas de fumo normal e transgênico. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste t ao nível de 5% (25 ± 2 °C, UR $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas).

Tabela 2: Digestibilidade aparente (AD), eficiência de conversão do alimento (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), custo metabólico (CM), das lagartas de *Heliothis virescens* criadas em discos foliares de fumo transgênico (transformado com gene *pin2* de batata) e fumo normal à 25 °C, UR de 60 ± 10% e fotofase de 14 horas.

Índices nutricionais	Fumo normal	Fumo transgênico
ECI (%)	21,342 ± 2.454 a	24,790 ± 1.228 a
ECD(%)	46,600 ± 10.917 a	63,509 ± 10.06 a
AD (%)	52,746 ± 3.778 a	47,680 ± 1.737 a
CM (%)	53,399 ± 10.917 a	36,491 ± 10.06 a

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste T, ao nível de 5% de probabilidade.

5.2 Imunodeteção

A fim de determinar se o promotor *vspA* era capaz de ativar a expressão do gene *pin2* após lesão, amostras de folhas (transgênicas e normais) foram coletadas 24 horas após a realização da indução nas mesmas. De acordo com observações preliminares (Steve Gleddie, comunicação pessoal), a expressão do gene *pin2* é máxima 24 horas após a ocorrência da lesão. Os resultados com o anticorpo anti-PIN2 revelaram a presença de uma banda de tamanho semelhante ao inibidor de batata expresso nas plantas transgênicas (Figura 3, canaleta 6). Além disso, confirmando a expressão sistêmica do inibidor, um sinal semelhante foi observado em folhas situadas abaixo e acima da lesão (Figura 3, canaletas 7 e 8, respectivamente). Curiosamente, não foi observada a presença de uma banda correspondente ao PIN2 na raiz de plantas

transgênicas (Figura 3, canaleta 5). Entretanto, extratos de folhas normais, mesmo após a lesão, não apresentaram a banda correspondente ao inibidor PIN2 (Figura 3, canaletas 1 a 4).

Figura 3: Imunodeteção.

- 1- Extrato de raiz de plantas de fumo normal;
- 2- Extrato de caule de plantas de fumo normal;
- 3- Extrato de folha de baixo da lesão de plantas de fumo normal;
- 4- Extrato de folha acima da lesão de plantas de fumo normal;
- 5- Extrato de raiz de plantas de fumo transgênicos;
- 6- Extrato de caule de plantas de fumo transgênicos;
- 7- Extrato de folha abaixo da lesão de plantas de fumo transgênicos;
- 8- Extrato de folha acima da lesão de plantas de fumo transgênicos.

5.3 Ensaios Bioquímicos

5.3.1 Separação das enzimas por cromatografia

A atividade eluída da coluna de troca hidrofóbica (Metil-HIC), proveniente de lagartas alimentadas com dieta artificial apresentou dois picos: um mais hidrofóbico e um com menor hidrofobicidade, enquanto para tripsinas provenientes de lagartas alimentadas com folhas de fumo transgênico e normal, apareceu apenas um pico de atividade, entretanto, mais hidrofóbico que aquele encontrado no material de dieta artificial (Figura 4). Durante a separação das enzimas por cromatografia, ocorreram diferenças nas recuperações em todas as cromatografias testadas: High Q, High S e Metil (Tabela 3). A diferença existente entre elas poderia ser atribuída à presença de um inibidor e à expressão de uma tripsina nas lagartas criadas em folha normal e transgênica, já que foi aplicada a mesma quantidade de proteína. A presença dos IPs foi responsável por uma diminuição de 2,5 vezes na atividade trípica *in vivo* (os valores encontrados para o material transgênico são intermediários aos valores encontrados para o material proveniente de folhas de fumo normal).

Figura 4: Cromatografia hidrofóbica das frações solúveis de: A: Homogeneizado intestinal proveniente de lagartas de *H. virescens* criadas em dieta artificial; B: homogeneizado intestinal proveniente de lagartas criadas em discos foliares de plantas de fumo normal; C: homogeneizado intestinal proveniente de lagartas criadas em discos foliares provenientes de plantas de fumo transgênico. A coluna Metil-HIC (Econo System – BioRad) foi equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 6,8, contendo sulfato de amônio 1,7 M. Eluição foi feita com um gradiente de 1,7 – 0 sulfato de amônio no mesmo tampão. Substrato usado: BApNA.

Tabela 3: Diferentes recuperações das atividades enzimáticas dos homogeneizados intestinais de *H. virescens* criadas nas três dietas através de diferentes métodos de separação.

Passos Cromatográficos	Recuperação (%)		
	Fumo Normal	Dieta Artificial	Fumo Transgênico
Metil HIC	247	100	113,5
High Q	121	66	155
High S	288	100	140

5.3.2 Cinética enzimática

Observa-se uma única reta nos gráficos dos inversos da velocidade X concentração de BApNA do extrato intestinal de lagartas criadas em dieta artificial, indicando a presença de uma tripsina com $K_m = 0.3 \pm 0.05$ mM (enzima 1) ou então, de várias tripsinas com valores de K_m s similares (Figura 5A). A análise dos gráfico dos inversos da velocidade X concentração de BapNa para os extratos intestinais de lagartas alimentadas com folhas de fumo normal ou transgênico, indicou a presença de duas retas, caracterizando a presença de duas atividades trípticas, cujos respectivos K_m s calculados foram: 0.015 ± 0.03 mM (enzima 1) e 0.02 ± 0.01 mM (enzima 2) (Figura 5B e C). Os resultados obtidos a partir da determinação dos K_m s sugerem a síntese de uma nova proteinase.

Figura 5: Efeito da concentração de BApNa sobre as diferentes atividades de tripsina. A: gráfico dos inversos da concentração de BApNa e da velocidade sobre tripsina de *Heliothis virescens* criadas em dieta artificial. B: *H. virescens* criadas em folhas de fumo normal. C: *H. virescens* criadas em folhas de fumo transgênico.

5.3.3 Isolamento das diferentes atividades proteolíticas através de eletroforese

Para os homogeneizados intestinais provenientes de dieta artificial apareceram quatro atividades, sendo uma delas majoritária (Figura 6A), enquanto que lagartas alimentadas com folhas apresentam um perfil similar, mas com maior contribuição das tripsinas de menor migração (T1 e T2, Figura 6B e C). As frações onde aparece a atividade para quimotripsina não coincidem com as frações onde aparece a atividade das tripsinas e, independente do tratamento, o perfil é o mesmo (Figuras 7A, B e C). Para as elastases, sua atividade é apenas detectada nos homogeneizados provenientes de lagartas alimentadas à base de folhas de fumo (Figura 8), indicando que sua expressão é modulada de acordo com o alimento ingerido (presença de PIs).

Figura 6: Separação por eletroforese das tripsinas em gel de poliacrilamida (7,5 – 12%) em presença de SDS. (A) homogeneizados intestinais de *H. virescens* provenientes de lagartas alimentadas com dieta artificial; (B) com folhas de fumo normal; (C) com fumo transgênico, sobre o substrato CBZAMCA. Frações 9 –15 (T1), 17 –23 (T2), 30 –37 (T3) e 42 –48 (T4).

Figura 7: Separação por eletroforese das quimotripsinas em gel de poliacrilamida (7,5 – 12%) em presença de SDS. (A) homogeneizados intestinais provenientes de lagartas de *H. virescens* alimentadas com dieta artificial; (B) com folhas de fumo normal; (C) com fumo transgênico, sobre o substrato SAAPMCA.

Figura 8: Separação por eletroforese das elastase em gel de poliacrilamida (7,5 – 12%) em presença de SDS. (A) homogeneizados intestinais provenientes de lagartas de *H. virescens* alimentadas com dieta artificial; (B) com folhas de fumo normal; (C) com fumo transgênico, sobre o substrato AcAAApNa.

5.3.4 Determinação das endopeptidases através de gel de atividade

A identificação das endopeptidases foi obtida por tratamento de uma duplicata do gel de gelatina (Figura 9A) com benzamidina (100 mM), um inibidor de tripsina (Figura 9B). Este inibidor não se mostrou específico para tripsina, inibindo também quimotripsina. Com base nos pesos moleculares calculados de acordo com eletroforese nativa (Figura 10) classificou-se as endopeptidases presentes no gel de gelatina (Figura 9A) como sendo tripsinas (T1, T2, T3, T4) e quimotripsina (Q). Não foi detectada atividade de elastase (peso molecular esperado de 35 kDa). As tripsinas T1 (70 kDa) e T2 (67 kDa) ocorrem em maior quantidade nos homogeneizados proveniente de tratamento à base de folhas (Tratamentos II e III). Já as tripsinas T3 (29 kDa) e T4 (17 kDa), estão mais ativas em todos os tratamentos. A atividade da quimotripsina foi semelhante em todos os homogeneizados.

Figura 9: Ensaio das proteinases após SDS- PAGE.

(A) I homogeneizado intestinal proveniente de lagartas criadas em dieta artificial, diluído 5 vezes (1) e diluído 10 vezes (2); II homogeneizado intestinal proveniente de lagartas criadas em fumo normal, diluído 5 vezes (3) e diluído 10 vezes (4); III homogeneizado intestinal proveniente de lagartas de *H. virescens* criadas em fumo transgênico, diluído 5 vezes (5) e diluído 10 vezes (6). (B) Ensaio das proteinases após SDS- PAGE em presença de benzamidina. Tripsinas: T1(70 kDa), T2 (67 kDa), T3 (29 kDa), T4 (17 kDa) e Quimotripsina: Q (26 kDa).

5.3.5 Oligomerização das atividades das tripsinas intestinais de *H. virescens*

O peso molecular das tripsinas T1 e T2 (70 kDa e 67 kDa, respectivamente) é aproximadamente duas a três vezes maior que os valores de T3 e T4 (29 kDa e 17 kDa, respectivamente) (Figura 9). Embora T1 e T2 tenham apresentado um maior peso molecular, é possível que sejam oligômeros de T3 e T4 que permanecem separados em presença de SDS. A fim de verificar a ocorrência de oligômeros, amostras intestinais das lagartas foram eletroforéticamente separadas na ausência de SDS. Os pesos moleculares das tripsinas foram determinados através do cálculo da taxa de migração em géis cilíndricos de poliacrilamida com diferentes concentrações. Para os extratos intestinais provenientes de dieta artificial, uma atividade tríptica com 30 kDa foi observada, enquanto que para material proveniente de dieta à base de folhas, duas atividades foram obtidas: 60 kDa e 48,5 kDa (Figura 10). Os valores obtidos em lagartas alimentadas com folhas foram similares a T1 e T2 determinados na presença de SDS (Figura 9), enquanto que T3 e T4 não foram detectadas, sugerindo que na ausência de SDS eles ocorrem na forma de oligômeros.

A filtração em gel não é a mais indicada para determinar atividades trípticas individuais, nem para determinar pesos moleculares precisos devido à curva padrão insatisfatória, obtida na presença de SDS. Contudo, a técnica é suficientemente eficiente para separar tripsina de alto peso molecular (T1 + T2) das de baixo peso molecular (T3 + T4). Os resultados mostram que na presença de SDS, a maior parte da atividade de tripsina das lagartas alimentadas com dieta apresenta baixo peso molecular, enquanto que nas lagartas alimentadas com folhas, as tripsinas de baixo e alto peso molecular

ocorrem em quantidades similares (Figura 11A). Na ausência de SDS, a atividade das tripsinas de ambas as lagartas está dispersa numa fração de alto peso molecular (Figura 11B). Os resultados da filtração em gel estão de acordo com os resultados da eletroforese: lagartas alimentadas com folhas apresentam mais atividade triptica de alto peso molecular que as lagartas alimentadas com dieta artificial e, em presença de SDS, aumentam a quantidade de tripsinas de baixo peso molecular.

Figura 11: Filtração em gel das frações solúveis dos homogeneizados intestinais de *H. virescens* mantidas em dieta artificial (O) ou com folhas de fumo (●) em presença (A) ou ausência (B) de SDS. A coluna superose 12 HR 10/30 (FPLC) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, contendo 0,5% de SDS. Substrato usado: ZAMCA.

Figura 10: Determinação dos valores de peso molecular por PAGE em condições nativas. Enzimas de: lagartas de *H. virescens* alimentadas com dieta (■) e de lagartas alimentadas com folhas (◆, ◇). (A) e (B) efeito de diferentes concentrações de gel de poliacrilamida na migração eletroforética das atividades de tripsina. RM, migração eletroforética da enzima em relação ao corante. (C) Determinação dos valores de peso molecular das tripsinas das lagartas da dieta (■) e de lagartas alimentadas com folhas (◆, ◇) por método de Hendrick and Smith (1968). Marcas de peso molecular (●): mioglobina: 17,8 kDa; catalase 232 kDa e ferritina 450 kDa. Substrato usado: ZAMCA.

6-DISCUSSÃO

A presença conjunta de inibidores naturais do fumo e do inibidor de batata (PIN2) em plantas transgênicas não afetou a duração da fase larval de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) quando comparada a dieta à base de folhas de fumo não transformado. Além disso, a duração das fases larval (e sua mortalidade) e pupal, o consumo e utilização do alimento, foram semelhantes nos dois tratamentos. Qual a possível explicação para a ausência de efeitos deletérios ao desenvolvimento do inseto? A resposta pode estar relacionada à alta semelhança entre os inibidores naturalmente encontrados em folhas de fumo e o inibidor PIN2 de batata. Pearce e colaboradores (1993) mostraram que os inibidores de proteinases presentes no fumo pertencem à mesma família do inibidor PIN2. Além disso, fumo e batata pertencem à mesma família: Solanaceae. Como *H. virescens* é praga de fumo, provavelmente seu conjunto de proteinases digestivas também seja capaz de se adaptar aos IPs produzidos pela batata. As únicas diferenças encontradas entre os tratamentos com folhas, foram observados no peso das pupas fêmeas (inferior no tratamento com folhas de fumo transgênico) e na mortalidade das pupas (maior no tratamento com transgênico). Este é um dado importante uma vez que o peso das pupas que originaram fêmeas poderá afetar a

fecundidade de *H. virescens* como observado por Shaheen et al. (1992) para *Bombyx mori* e por Li et al. (1996) para *Helicoverpa armigera*, sendo que neste caso, o número de ovos/fêmeas foi reduzido pela metade.

O fato de *H. virescens* ser um inseto polífago (Fitt, 1989) sugere que, durante a evolução, as lagartas tiveram contato com diferentes espécies e gêneros vegetais os quais, apresentavam uma ampla gama de inibidores de proteinase. Este contato proporcionou o desenvolvimento de mecanismos que sobrepõem o efeito nocivo dos inibidores.

Os resultados biológicos não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (plantas transgênicas ou não transformadas) no que se refere a efeitos deletérios sobre as lagartas de *H. virescens*. Aparentemente, as lagartas desenvolveram um possível mecanismo adaptativo de modo a contornar os efeitos dos IPs, conforme observações recentes na literatura (Jongsma e Bolter, 1997; Broadway, 1997, Gatehouse et al., 1997). Assim sendo, tornou-se de suma importância a caracterização bioquímica das enzimas digestivas das lagartas a fim de fornecer subsídios ao entendimento dos resultados.

A análise das enzimas digestivas de lagartas de *H. virescens* que foram alimentadas com plantas de fumo (transgênico e controle) mostraram a presença de quatro tripsinas com diferentes pesos moleculares (T1, T2, T3 e T4). As enzimas T3 e T4 não foram detectadas em géis de eletroforese na ausência de SDS, enquanto que as tripsinas de alto peso molecular foram detectadas em maior quantidade em filtração em gel na ausência de SDS, o que sugere que as formas T3 e T4 originaram por oligomerização as formas T1 e T2 (alto peso molecular). Baseando-se nestas

observações, acredita-se que T4 origina T2 enquanto que T3 dá origem a T1. As propriedades físico-químicas de T1, T2, T3 e T4 são muito similares pois não foi possível separá-las por cromatografia hidrofóbica nem por cromatografia de troca catiônica ou aniônica. Esta hipótese está de acordo com o fato que todas as tripsinas de insetos estudadas (Terra e Ferreira, 1994) possuem valores de peso molecular próximos aos valores das tripsinas de menor peso de *H. virescens*. A proposta de oligomerização não é um processo causado pelos componentes da folha, pois um centrifugado foliar misturado ao homogeneizado de lagartas criadas em dieta artificial não aumentou a atividade de tripsinas de alto peso molecular.

Os valores de K_m para T1 e T2 são muito menores que os valores observados de T3 e T4 das lagartas alimentadas à base de folhas. A existência de tripsinas com K_m s muito diferentes foi confirmado com os valores obtidos de homogeneizados não fracionados. Caso as tripsinas de alto peso molecular encontrados nas lagartas alimentadas à base de folhas sejam oligômeros das tripsinas de baixo peso molecular, seus valores de K_m devem resultar de um processo de oligomerização. Neste sentido, os sítios ativos das formas monoméricas são provavelmente distorcidos já que a afinidade pelo substrato aumenta (valores baixos de K_m). O efeito da oligomerização na atividade enzimática é conhecido em enzimologia. A ácido graxo sintetase, por exemplo, é composta de dois peptídeos idênticos com dois sítios ativos cada um. Quando ligados formam dois sítios adicionais entre eles (Chang e Hames, 1990).

As lagartas alimentadas com dieta apresentaram uma atividade de tripsina principal (T3) demonstrada por SDS-PAGE (29 kDa) e PAGE em condições nativas. Embora as formas de peso molecular mais altas possam se formar na ausência de SDS, o

efeito da concentração do substrato na atividade triptica determinada em homogeneizados não fracionados, mostra um único valor de K_m . Isto indica que os monômeros e oligômeros de tripsina não têm grandes diferenças em suas propriedades cinéticas.

Os oligômeros de tripsina são formados de monômeros em ambas as lagartas alimentadas com folhas ou dieta. Todavia, os oligômeros formados em lagartas alimentadas com folhas apresentaram propriedades cinéticas diferentes dos monômeros, sendo ainda altamente estáveis, enquanto que os oligômeros formados em lagartas alimentadas com dieta foram menos estáveis e aparentemente apresentaram as mesmas propriedades cinéticas dos monômeros. A conclusão deste fato é que o aumento nas formas moleculares de maior peso (T1 e T2), nas lagartas alimentadas com folhas, foi uma consequência dos novos monômeros sintetizados (T3 e T4) que são diferentes dos monômeros de tripsina encontrados em lagartas provenientes de dieta.

Os resultados da cromatografia hidrofóbica forneceram subsídios para explicar por que os oligômeros de lagartas alimentadas com folhas foram mais estáveis que os encontrados em lagartas criadas em dieta. As atividades dos monômeros de tripsinas das lagartas criadas em folha mostraram-se mais hidrofóbicos que aqueles encontrados em lagartas alimentadas com dieta artificial e provavelmente, foram mais capazes de manterem-se ligados, levando à formação de oligômeros em comparação aos monômeros de lagartas criadas em dieta. Um aspecto interessante desta hipótese é que permite inferir que há um pequeno número de mutações pontuais no genoma, causando a substituição de uns poucos aminoácidos na molécula da enzima, o que pode levar à

formação de oligômeros com alterações em suas propriedades cinéticas. Estes oligômeros podem ser insensíveis aos IPs.

A adaptação de *H. virescens* aos inibidores envolveu basicamente: (1) expressão de novas moléculas de tripsina que apresentaram uma superfície hidrofóbica, os quais, favoreceram a formação de oligômeros por ligação hidrofóbica. Como os oligômeros possuíam uma maior afinidade pelo substrato (menores valores de K_m), isto resultou numa diminuição da inibição pelos IPs, uma vez que eles são inibidores competitivos (Laskowski e Kato, 1980). Além disso, pode-se especular que os oligômeros têm menor afinidade pelos IPs que os monômeros, ou que eles inativem os IPs. Esta possibilidade pode ser resultado de uma pequena alteração na especificidade da enzima tornando um substrato ruim (o IP) em um bom substrato, conforme descrito por Giri et al (1998); (2) a expressão de uma enzima do tipo elastase, que passaria a auxiliar no processo digestivo.

Entretanto, provavelmente as mudanças das tripsinas foram mais importantes na adaptação que a elastase, já que as tripsinas foram mais ativas. As enzimas do tipo quimotripsina aparentemente não foram afetadas pelo processo de adaptação.

Uma observação interessante mostrou que as lagartas expressam tripsinas resistentes aos IPs apenas quando expostas a estes inibidores. Isto sugeriu que as tripsinas encontradas em lagartas alimentadas em dietas livres de IPs seriam menos eficientes do que aquelas encontradas em dietas contendo os inibidores. A confirmação destas suposições dependeria do isolamento e caracterização detalhada das proteinases encontradas em lagartas alimentadas em ambas as dietas.

7 CONCLUSÕES

- ❖ As plantas transgênicas de fumo expressando o inibidor de proteinase do tipo 2 de batata (PIN2) não afetaram o desenvolvimento e a mortalidade larval de *Heliothis virescens* bem como o consumo e utilização do alimento;
- ❖ A adaptação aos inibidores de proteinase de fumo ocorre através da expressão de uma nova isoforma de tripsina que é capaz de formar oligômeros;
- ❖ A formação de oligômeros aumenta a afinidade pelo substrato, resultando numa menor inibição pelos IPs, uma vez que eles são inibidores competitivos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.16793-16797, 1987.
- ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin – molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v.209, p.933-937, 1992.
- ALVES, L.C.; ALMEIDA, P.C.; FRANZONI, L.; JULIANO, M.A. Syntesis of N α -protected aminoacyl 7-amino- 4-methyl- coumarin amide by phosphorous oxylchloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. **Peptide Research**, v.9, p.92-96, 1996.
- ATKINSON, A.H.; HEALTH, R.L.; SIMPSON, R.J.; CLARKE, A.E.; ANDERSON, M.A. Proteinase inhibitors in Nicotiana alata stigmas are derived from a precursor protein which is processed into 5 homologous inhibitors. **Plant Cell**, v.5, p.203-213, 1993.

BALANDIN, T.; DOES, C.V.; ALBERT, J.M.B.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M.

Structure and Induction Pattern of a Novel Proteinase Inhibitor Class II gene of Tobacco. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.1197-1204, 1995.

BALDWIN, I.T.; PRESTON, C.A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v.208, p.137-145, 1999.

BARBER, G.W. Seasonal Availability of Food Plants of two Species of *Heliothis* in Eastern Georgia. **Journal of Economic Entomology**, v.30, p.150-158, 1937.

BISHOP, P.D.; PEARCE, G.; BRYANT, J.E.; RYAN, C.A. Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 13172-13177, 1984.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal Biochemistry**, v.204, p.433-451, 1992.

BOLTER, C.J.; JONGSMA, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal Insect Physiology**, v.41, n.12, p.1071-1078, 1995.

BOTTRELL, D.G.; ADKISSON, P.L. Cotton insect pest management. **Annual Review Entomology**, v.22, p.541-582, 1977.

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially Regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p.625-638, 1997.

BRADFORD, M.M. Interaction of Partially-Purified Amylases from Larval *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) with Amylase Inhibitors from Wheat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.93B, p.239-246, 1976.

BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal Insect Physiology**, v.43, n.9, p.855-874, 1997.

BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A.. Plant Proteinase Inhibitors: A Defense Against Herbivorous Insects?. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.41, p.33-38, 1986.

BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal Insect Physiology**, v.32, p.673-680, 1986

BROADWAY, R.M. Purification and partial characterization of trypsin/chymotrypsin inhibitors from cabbage. **Phytochemistry**, v.33, p.21-27, 1993.

BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitor?. **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.107-116, 1995.

BROADWAY, R.M. Resistance of plants to herbivorous insects: Can this resistance fail?. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.18, p.476-481, 1996.

BROWN, W.E.; TAKIO, K.; TITANI, K.; RYAN, C.A. Wound - induced trypsin inhibitor in alfalfa leaves: identity as member of the Bowman - Birk inhibitor family. **Biochemistry**, v.24, p.2105-2108, 1985.

BRYANT, J.; GREEN, T.R.; GURUSADDAIAH, T.; RYAN, C.A. Proteinase inhibitor II from potatoes: isolation and characterization of its promoter components. **Biochemistry**, v.15, p.3418-3424, 1976.

BURGESS, E.P.J.; STEVENS, P.S.; KEEN, G.K.; LAING, W.A.; CHRISTELLER, J.T. Effects of proteinase inhibitors and dietary protein level on the black field cricket *Teleogryllus commodus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.61, p.123-130, 1991.

BUTT, B.A.; CANTU, E. **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, 7p, 1962.

CHANG, S.; HAMES, G.G. Structure and mechanism of action of a multifunctional enzyme: fatty acid synthase. **Accounts of Chemical Research**, v.23, p.363-369, 1990.

CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P.; BURGESS, E.P.J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.735-746, 1992.

DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D.; WU, R. Transgenic Rice Plants Harboring an Introduced Potato Proteinase Inhibitors II Gene are Insect Resistant. **Nature Biotechnology**, 14, v.494-498, 1996.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.95, p.271-278, 1961.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.107A, p.631-641, 1994a.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Digestive enzymes in midgut cells, endo and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, v.26, p.299-313, 1994b.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review Entomology**, v.34, p.17-52, 1989.

GATEHOUSE, A.M.R.; SHI, Y.; POWELL, K.S.; BROUGH, C.; HILDER, V.A.;
HAMILTON, W.D.O.; NEWELL, C.A.; MERRYWEATHER, A.; BOULTER, D.;
GATEHOUSE, J.A. Approaches to Insect Resistance Using Transgenic Plants.
Phylosophical Transactions of the Royal Society of London - Serie B, v.342,
p.279-286, 1993.

GATEHOUSE, L.N.; SHANNON, A.L.; BURGESS, E.P.J.; CHRISTELLER, J.T.
Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera*
larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitor in
diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, n.11, p.929-944, 1997.

GATEHOUSE, A.M.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BABBÉ, S.M.; NEWELL,
C.A.; GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth,
Lacanobia oleracea; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo.
Journal Insect Physiology, v.45, p.545-558, 1999.

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

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

GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v.175, p.776-777, 1972.

GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; DELÈGUE, M.P.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, p.229-237, 1998.

HAMBLETON, E.J. *Heliothis virescens* as a Pest of Cotton, with Notes on Host Plants in Peru. **Journal of Economic Entomology**, v.37, p.660-666, 1944.

HENDRICK, J.L. AND SMITH, A.J., Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc-gel eletrophoresis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.126, p.155-164, 1968.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A Novel Mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.330, p.161-163, 1987.

JANY, K.D.; BEKELAER, K.; PFLEIDER, G.; ISAHAY, J. Amino acid sequence of an insect chymotripsin from the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*. **Biochemistry and Biophisics research commun**, v.110, p.1-7, 1983.

JANY, K.D.; HAUG, H.; PFLEIDER, G.; ISAHAY, J. Enzymatic and chemical properties of an endopeptidases from the larva of the hornet, *Vespa cabro*. **Biochemistry**, v.17, p.4675-4682, 1978.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; GYNHEUNG, AN.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitor I and it in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy Science. USA**, v.86, p.9871-9875, 1989.

JOHNSTON, K.A.; LEE. M.J.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, J.H. The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry**, v.21, n.4, p.389-397, 1991.

JOHNSTON, K.A.; LEE. M.J.; BROUGH, C.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Proteinase activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p.375-383, 1995.

JONGSMA, M.A.; BAKKER. P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Science. USA**, v.92, p.8041-8045, 1995.

JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal Insect Physiology**, v.43, p.885-895, 1997.

JORDÃO, B.J.T., TERRA, W.R., RIBEIRO, A.F., LEHANE, M.J., FERREIRA, C.

Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, p.337-346, 1996.

KEIL, M.; SANCHEZ-SERRANO, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). **Nucleic Acid research**, v.14, n.14, p.5641-5650, 1986.

KINCADE, R.T.; LASTER, M.L.; BRAZZEL, JR. Damage two cotton by the tobacco budworm. **Journal Economic Entomology**, v.60, p.1163-1164, 1967.

KOGAN, J.; SELL, D.K.; STINNER, R.E.; BRADLEY,.; KOGAN, M.V. Bibliography the *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (F) (Lepidoptera: Noctuidae). **INTSOY**, v.17, 1978.

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

LAROCQUE, A.M.; HOUSEMAN, J.G. Effect of ingested soybean, ovomucoid and corn protease inhibitors on digestive processes of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal Insect Physiology**, v.36, n.9, p.691-697, 1990.

LASKOWSKI, M.J.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review Biochemistry**, v.49, p.593-626, 1980.

- LEMOS, F.J.A.; TERRA, W.R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.613-619, 1992.
- LI, Q.; GAO, Z.; WANG, Z.; LI, Q.S.; GAO, Z.R.; WANG, W.X.; WANG, Z.M. Resistance of the cotton variety Zhonggzhi 372 to cotton bollworm. **Plant Protection**, v.22, n.5, p. 17-19, 1996.
- McMANUS, M.T.; BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal Insect Physiology**, v.41, n.9, p.731-738, 1995.
- McMANUS, M.T.; WHITE, D.W.R.; MCGREGOR, P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Research**, v.3, p.50-58, 1994.
- MARTIN, S.H.; ELZEN, G.W.; GRAVES, J.B.; MICINSKI, S.; LEONARD, B.R.; BURRIS, E. Toxicological responses of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Louisiana, Mississippi and Texas to selected insecticides. **Journal Economic Entomology**, v.88, p.505-511, 1995.
- METCALF, C.L.; FLINT, W.P.; METCALF, R.L. **Destructive and useful insects**. New York: McGRAW-HILL, 1962.
- MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.4-6, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

OLIVA, M.L.V.; GRISOLIA, D.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Serine and SH-proteinase inhibitors from *Enterolobium contortisiliquum* beans. **Journal of Medical and Biological Research**, v.20, p.767-770, 1987.

PARENCIA, C.R. One-hundred twenty years of research on cotton insects in the United States. **Agriculture Handbook**. Washington, USDA, Agricultural Research Service, 515, 75p., 1978.

PANIZZI, A.R; PARRA, J.R.P. **Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas**. São Paulo: Editora Manole LTDA, Cap. II, p.9-65: Consumo e utilização de alimentos por insetos. 1991.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. 3.ed. Piracicaba: FEALQ, p.137, 1996.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos, in S.B. Alves (ed.), **Controle Microbiano de insetos**. Piracicaba, Fealq, 1998. Cap.35, p.1015 – 1038.

PEARCE, G.; SY, L.; RUSSEL, C.; RYAN, C.A.; HASS, G.M. Isolation and characterization from potato tubers of two polypeptide inhibitors of serine proteinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.213, p.456-462, 1982.

- PEARCE, G.; STRYDOM, D. JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase-inhibitor proteins. **Science**, v.253, p. 895-898, 1991.
- PEARCE, G.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase isoinhibitors of the potato inhibitor II family. **Plant Physiology**, v.102, p.639-644, 1993.
- PEÑA-CORTES, H.; FISAHN, J.; WILLMITZER, L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. **Proceedings of the National Academy of Science. USA**, v.92, p.4106-4113, 1995.
- PLUNKETT, G.; SENEAR, D.F.; ZUROSKE, G.; RYAN, C.A. Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plant: purification and properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.213, p.463-472, 1982.
- PRICHETT, D.W.; YAUNG, S.Y.; GEREN, C.R. Proteolytic activity in the digestive fluid of larvae of *Trichoplusia ni*. **Insect Biochemistry**, v.11, p.523-526, 1981.
- PURCELL, J.P.; GREENPLATE, J.T.; SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, n.1, p.41-47, 1992.
- RICHARDSON, M. Proteins inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**, v.6, p.235-253, 1981.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In **Methods in Plant Biochemistry**, v.5, p.259-306, 1991.

RYAN, C.A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for improving defenses against insect and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-449, 1990.

SHAHEEN, A; TRAG, A.R.; NABI, G.; AHAMAD, F. Correlations between female pupal weight and fecundity in bivoltine silkworm *Bombyx mori* L. **Entomology**, v.17, n.1, p.109-111, 1992.

SOUZA, E.M.T.; MIZUTA, K.; SAMPAIO M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v.39, p.521-525, 1995.

TABASHNIK, E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, v.39, p.47-49, 1994.

TANAKA, A.S.; SAMPAIO, M.U.; MARANGONI, S.; DE OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C.; OLIVA, M.L.V.; FINK, E.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis*. **Biological Chemistry**, v.378, p.273-281, 1997.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109B, p.1-62, 1994.

THOMAS, J.C.; ADAMS, D.G.; KEPPE, U.D.; WASMANN, C.C.; BROWN,

J.K.; KANOST, M.R.; BOHNERT, H.J. *Manduca sexta* encoded proteinase inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.33, p.611-614, 1995.

WALDBAUER, G.P. The consumption and utilization of food by insects. **Advances Insect Physiology**, v.5, n.1, p.229-288, 1968.

WARD, C.W. Properties and specificity of the major anionic trypsin-like enzyme in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.319, p.201-211, 1995.

WARD, C.W. Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. **Australian journal of Biology Science**, v.28, p.1-23, 1975.

WOLFSON, J.L.; MURDOCK, L.L. Potencial use of protease inhibitors for host plant resistance: a test case. **Environmental Entomology**, v.24, p.52-57, 1995.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, p. 1-6, 1992.

XU, D.P.; XUE, Q.Z.; McELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V.A.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin-inhibitor gene, CpTI, in transgenic rice plants confers resistance to 2 major rice insect pests. **Molecular Breeding**, v.2, p. 167-173, 1996.