**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis*
(Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar**

Ane Hackbart de Medeiros

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2008**

Ane Hackbart de Medeiros
Engenheira Agrônoma

Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar

Orientador:
Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA-FILHO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Medeiros, Ane Hackbart de

Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis*
(Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar / Ane Hackbart de Medeiros. - -
Piracicaba, 2008.
101 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Brocas (Insetos nocivos) 2. Cana-de-açúcar 3. Expressão gênica
4. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 633.61
M488i

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

Dedico

Ao meu pai,

Dr. Antônio Roberto Marchese de Medeiros,
por ter servido de inspiração à minha profissão
e carreira científica.

e

À minha mãe,

Éli Hackbart de Medeiros,
pelo apoio incondicional durante todas as fases de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Marcio Castro, pela oportunidade de realizar este projeto. Seu entusiasmo contagiante por cada pequeno progresso e as discussões sobre as implicações dos resultados tiveram um grande impacto em minha pesquisa. Agradeço por sempre ter um tempo disponível na sua agenda para conversar sobre meus projetos, e por não poupar esforços para que meu trabalho fosse realizado;

Ao professor Daniel Moura, que tive a honra de ter como co-orientador, agradeço pela participação ativa e inestimáveis sugestões na realização de todos os experimentos desse trabalho. As discussões e troca de idéias sobre ciência e a importância da pós-graduação na formação de cientistas engrandeceram minha formação;

Aos queridos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela troca de experiências na bancada e pela paciência durante a minha transição da área de entomologia para a de biologia molecular de plantas. Agradeço aos ex-alunos Carolina Morgante, Larissa Nadalini e Daniela Brioschi, Kátia Claudino, Mariana Cia, Ana Paula Rizzato, e aos atuais alunos do laboratório, Celso Fiori, Camila Borgonovi, Fabiana Mingossi, Ligia Arruda, Daniele Bononi, Juliana Matos, Marcela Scarso, Christine Stock, Joze Corrêa e aos novos ingressantes Luíza Dantas e Ricardo Rodrigues, pela troca de protocolos e pelo alegre convívio diário, que com certeza ajudaram a encarar os experimentos frustrados;

A saudável convivência e troca de idéias com os amigos do Laboratório de Biologia Celular, que enriqueceram meus conhecimentos de genética aplicada ao melhoramento de plantas;

Aos colegas do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos colegas do programa de pós-graduação em Entomologia, pelos conhecimentos compartilhados nesta área multi-disciplinar que é o estudo das interações planta-inseto;

Aos funcionários do Departamento de Genética, por tornarem o departamento um lugar muito agradável de trabalho;

Aos professores do Departamento de Genética que tive oportunidade de conhecer melhor, em especial, ao professor José Baldin e professora Maria Lúcia Vieira;

Agradeço ao Rafael Colombi, por manter sempre a ordem e organização do laboratório e pelo inestimável chá de erva-cidreira e ao Carlos Oliveira, pela ajuda e pelo bom-humor de sempre;

Às queridas Dra. Sabrina Chabregas e Dra. Cristina Falco do Centro de Tecnologia Canavieira, pelo apoio indispensável em todas as fases desse trabalho, por prontamente fornecer as plantas de cana-de-açúcar, lagartas de *Diatraea saccharalis* e pelo espaço de laboratório cedido para realização das hibridizações com os macroarranjos;

À Dra. Cassiara Gonçalves, do Centro de Tecnologia Canavieira, por ter fornecido e ajudado a cultivar os fungos usados nesse trabalho e por toda a ajuda com a revisão bibliográfica da interação broca-podridão;

À Dra. Juliana Felix e Dr. Renato Vicentini pela ajuda com a análise de dados dos macroarranjos;

Ao professor Antônio Figueira, do Laboratório de Melhoramento de Plantas, do CENA, por ter permitido a utilização do seu laboratório durante as infinitas horas de uso do PCR em tempo real;

Ao professor Luiz Coutinho, pelo uso do Storm 860 Phosphorimager scanner;

Aos amigos “moluscos” Monalisa Sampaio, Maurício Bento, Rosângela Bezerra, Ana Beatriz, Marcela Moura e o mais novo “molusquinho” Lucas Moura pela companhia e gargalhadas terapêuticas tão agradáveis e necessárias nos momentos de lazer;

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, Éli Medeiros, meu pai, Roberto Medeiros, minha irmã, Thaís, meu irmão Roland e prima Vivian, que me dedicaram carinho, confiança e compreensão, em todos os momentos de minha vida;

À grande família Delalibera, especialmente a Sra. Marlene e Sr. Italo, agradeço pela dedicação e hospitalidade nas agradáveis reuniões familiares e por entenderem minha ausência devido aos vários finais de semana no laboratório;

E, de maneira muito especial gostaria de agradecer ao meu querido Italo Delalibera Jr., a quem admiro como profissional e como pessoa, pelo apoio e incentivo. A convivência com um cientista com metas claras de realização profissional sem dúvida influenciou minhas escolhas, aumentou as expectativas perante a carreira e enriqueceu minha passagem pela pós-graduação. Seu amor e companheirismo transformam minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Respostas induzidas de plantas.....	13
2.2 Regulação dos mecanismos de defesa.....	14
2.3 Uso de <i>Expressed Sequence Tags</i>	15
2.4 Análise em larga escala da expressão gênica.....	15
2.5 Respostas induzidas da cana-de-açúcar a herbivoria.....	17
2.6 Estudo da resposta da cana-de-açúcar ao dano provocado por <i>Diatraea saccharalis</i> ...	19
2.7 Identificação de genes relacionados com defesa: Inibidores de serino proteases.....	20
2.8 Identificação de genes relacionados com defesa: Proteases.....	21
2.9 Serino proteases e defesa de plantas.....	23
2.10 Identificação de genes relacionados com defesa: Genes induzidos por dano ou <i>wound inducible</i>).	25
2.11 Proteínas do tipo barwin em cana-de-açúcar.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Plantas, insetos e tratamentos para caracterização de <i>sugarwin</i>	29
3.1.1 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	32
3.1.2 Monitoramento dos transcritos através de PCR em tempo real e análise dos resultados.....	32
3.1.3 Localização subcelular de SUGARWIN1 e 2.....	33
3.1.4 Expressão heteróloga de SUGARWIN em <i>Escherichia coli</i>	34
3.1.5 Teste do efeito de SUGARWIN1 no crescimento e desenvolvimento de lagartas de <i>D. saccharalis</i>	36
3.1.6 Teste de inibição de crescimento de fungos filamentosos.....	37
3.1.7 Teste de inibição de germinação de esporos de fungos filamentosos.....	38
3.2 Macroarranjos contendo seqüências de serino proteases e inibidores de serino proteases de cana-de-açúcar.....	38
3.2.1 Experimento biológico.....	38

3.2.2 Sonda <i>overgo</i>	38
3.2.3 Hibridizações com populações de cDNAs de cana.....	39
3.2.4 Aquisição e análise de dados.....	40
4 RESULTADOS.....	42
4.1 <i>Sugarwin</i> : um gene de cana-de-açúcar induzido por <i>D. saccharalis</i>	42
4.1.1 Comparação entre estruturas primárias de proteínas contendo o domínio barwin e as novas proteínas SUGARWIN1 e 2.....	42
4.1.2 Expressão diferencial dos genes <i>sugarwin</i> em relação a herbivoria, ferimento e metil jasmonato.....	44
4.1.3 Localização subcelular de SUGARWINS.....	46
4.1.4 Produção de SUGARWIN1 recombinante.....	50
4.1.5 Efeito de SUGARWIN1 em parâmetros biológicos de <i>D. saccharalis</i>	51
4.1.6 Efeito de SUGARWIN1 no crescimento micelial de fungos.....	52
4.1.7 Produção de SUGARWIN2 recombinante.....	52
4.1.8 Efeito de SUGARWIN2 na germinação de esporos de fungos.....	55
4.2 Análise dos macroarranjos contendo seqüências de cana-de-açúcar de serino proteases e inibidores de proteases.....	57
4.2.1 Construção de macroarranjos de seqüências de cana-de-açúcar e análise dos dados.....	57
4.2.2 Identificação de genes induzidos pelo ataque de <i>D. saccharalis</i>	58
4.2.3 Identificação de genes reprimidos pelo ataque de <i>D. saccharalis</i>	62
5 DISCUSSÃO.....	66
5.1 Caracterização de <i>sugarwin</i> : um gene de cana-de-açúcar induzido por <i>D. saccharalis</i>	66
5.2 Identificação de serino proteases e inibidores de serino proteases de cana-de-açúcar induzidos e reprimidos por <i>D. saccharalis</i>	70
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES.....	96

RESUMO

Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar

As plantas respondem ao ataque de insetos pela indução e acumulação de um conjunto grande de proteínas de defesa. Nesse trabalho foi feita uma investigação sobre as modificações transcricionais que ocorrem em plantas de cana-de-açúcar, em resposta ao ataque de lagartas de *Diatraea saccharalis*. A primeira abordagem foi o estudo detalhado da indução de duas isoformas do homólogo de cana-de-açúcar do gene de cevada induzido por dano *barwin* (*barley wound-inducible*), chamado de *sugarwin* (*sugarcane wound-inducible*). A indução de transcritos de *sugarwin* ocorreu em resposta ao ferimento mecânico, dano provocado por *D. saccharalis* e tratamento com metil jasmonato. Além disso, sua expressão foi restrita ao local de dano. *Sugarwins* fazem parte do grupo de genes induzidos tardiamente por dano. A localização subcelular do peptídeo sinal fusionado à *gfp* (*green fluorescent protein*) mostra que essas proteínas são secretadas. Embora a função do domínio *barwin* não esteja completamente elucidada, atividades anti-patogênicas têm sido descritas para um grande número de homólogos. Alinhamentos múltiplos de seqüências do domínio *barwin* das proteínas de cana-de-açúcar e de outras proteínas de mono e dicotiledôneas revelaram altos índices de similaridade, sugerindo que sua função é conservada entre espécies. Esse é o primeiro relato da indução de uma proteína da família *Barwin* por herbivoria. A atividade dessas proteínas contra insetos nunca foi estudada. Os resultados apresentados aqui sugerem que as *SUGARWINS* fazem parte da estratégia de defesa de cana-de-açúcar. A segunda abordagem para estudar a resposta da cana-de-açúcar ao dano por *D. saccharalis* foi a análise em larga-escala, usando macroarranjos de DNA, de serino proteases e inibidores de serino proteases de cana-de-açúcar diferencialmente expressos em resposta a herbivoria. Enquanto que a função dos inibidores de proteases na defesa de plantas contra insetos e patógenos está bem estabelecida, o envolvimento de proteases na defesa tem sido proposto recentemente. O monitoramento de transcritos de serino proteases de cana-de-açúcar responsivos a herbivoria revelou vários genes cuja função precisa ser investigada. Uma das aplicações desses resultados é a identificação de genes para uso em estratégias biotecnológicas que visam aumentar a resistência de cana-de-açúcar a insetos.

Palavras-chave: Defesa induzida; Expressão gênica diferencial; Cana-de-açúcar; *Diatraea saccharalis*; *Barwin*; Macroarranjos; Serino proteases; Inibidores de serino proteases

ABSTRACT

Identification and characterization of genes induced by *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane

Plants respond to insect damage by induction and accumulation of a large set of defense proteins. An investigation was undertaken to study the sugarcane transcriptional changes following *Diatraea saccharalis* damage. The first approach was a detailed study about the induction of two isoforms of a sugarcane homologue of a barley wound inducible gene, *barwin*, named *sugarwin* (sugarcane wound-inducible). Induction of *sugarwin* transcripts occurs in response to mechanical wounding, *D. saccharalis* feeding and methyl jasmonate treatment. Their expression is restricted to the site of damage. *Sugarwins* are members of the late wound-inducible genes. The subcellular localization of the signal peptide fused to the gfp (green fluorescent protein) shows that these proteins are secreted. Although the exact function of the barwin domain has not been completely elucidated, antipathogenic activities has been described for a number of homologues. Multiple sequence alignment of barwin domain-containing sugarcane proteins and of mono and dicotyledoneous proteins reveals high similarity, suggesting that their function is conserved among species. This is the first report of a barwin-like protein induced by herbivory. The activity of this type of proteins against insects has never been studied. Based on the results presented here, it can be concluded that SUGARWINS are part of the sugarcane defense response strategy. The second approach to study the sugarcane response to *D. saccharalis* damage was the large-scale analysis, using DNA macroarrays, of serine proteases and serine protease inhibitors differently expressed in response to herbivory. While the protease inhibitor's function in defense is well-established, the involvement of proteases in defense has been recently proposed. The transcript monitoring of sugarcane serine proteases in response to herbivory revealed several candidate genes for further functional studies. One of the greatest applications of these results is the identification of genes for use in biotechnological strategies to improve sugarcane insect resistance.

Keywords: Induced defense; Differential gene expression; Sugarcane; *Diatraea saccharalis*; *Barwin*; Macroarrays; Serine proteases; Serine protease inhibitors

1 INTRODUÇÃO

As plantas são constantemente atacadas por insetos e patógenos que se utilizam de inúmeras estratégias de alimentação e colonização. As plantas evoluíram uma gama de armas químicas e físicas para se defenderem em resposta a essa diversidade de invasores, incluindo barreiras físicas e químicas pré-existentes, bem como respostas induzidas de defesa que se tornam ativadas ante a percepção do organismo invasor (WALLING, 2000; KESSLER; BALDWIN, 2002; AGRIOS, 2005). As defesas induzidas representam uma economia de recursos que podem ser alocados para outros processos fisiológicos enquanto a planta não está sendo atacada. A descoberta, feita por Green e Ryan (1972), de que a herbivoria induz a acumulação sistêmica de inibidores de proteinases em folhas de tomate, serviu como um marco do conceito de que a defesa de planta é um processo dinâmico. Esses autores mostraram que o mecanismo principal da defesa de plantas é limitar a habilidade do herbívoro em digerir e usar nutrientes essenciais de seu hospedeiro. Vários estudos têm mostrado que genes que codificam proteínas com propriedades anti-nutritivas ou que provocam a diminuição da qualidade da folhagem consumida por insetos são induzidos por herbivoria e pelo ácido jasmônico (CONSTABEL et al., 2000; REYMOND et al., 2000; CHEN et al., 2005).

As respostas das plantas ao ataque por herbívoros ou patógenos são orquestradas por uma reorganização enorme da transcrição e expressão de um grande conjunto de genes, incluindo aqueles com importância na defesa (AGRAWAL et al., 2003). Metodologias para a análise em larga-escala da expressão diferencial de genes têm permitido aos pesquisadores estudar as mudanças no “transcriptoma” que são iniciadas em resposta ao ataque por herbívoros (KESSLER; BALDWIN, 2002). A maioria desses estudos foi realizada com *Arabidopsis thaliana* (SCHENK et al., 2000; REYMOND et al., 2000, 2004; CHEONG et al., 2002; KEMPEMA et al., 2007), álamo (MAJOR; CONSTABEL, 2006) e *Nicotiana attenuata* (HALITSCHKE et al., 2001; VOELCKEL; BALDWIN, 2004). Estudos que envolvem a interação molecular planta-inseto são muito mais abundantes em dicotiledôneas do que em monocotiledôneas, especialmente em plantas que tiveram o genoma integralmente ou parcialmente sequenciado. Iniciativas para o sequenciamento do genoma de cana-de-açúcar têm sido tomadas, mas, devido à sua complexidade, esse trabalho ainda não foi concretizado. Progresso significativo foi obtido recentemente com o desenvolvimento de coleções de Etiquetas de Sequências Expressas

(*Expressed Sequence Tags, ESTs*) de cana-de-açúcar (VETTORE et al., 2001; CASU et al., 2001; CARSON; HUCKETT; BOTHA, 2002; MA et al., 2004).

Desde a conclusão do SUCEST (*Sugarcane EST Project*, VETTORE et al., 2001, 2003) a identificação de homólogos de genes descritos em outras espécies como envolvidos na resposta de defesa ou genes identificados como parte de vias que levam à ativação de genes de defesa ficou facilitada (FALCO et al., 2001; ROCHA et al., 2007). Parte dos genes que compreendem a rede regulatória das principais vias de transdução de sinais já foram identificados e compilados na base de dados *Sugarcane Signal Transduction (SUCAST)* (SOUZA et al., 2001; PAPINI-TERZI et al., 2005).

A cana-de-açúcar é cultivada em mais de 20 milhões de hectares nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, produzindo mais de 1,3 bilhões de toneladas de colmos. É geralmente usada para produção de açúcar, contribuindo em quase dois terços da produção mundial (MENOSSEI et al., 2008). Recentemente a cultura ganhou atenção redobrada porque o etanol derivado da cana representa uma fonte renovável de combustível.

A produtividade de lavouras de cana-de-açúcar é grandemente diminuída por diferentes estresses bióticos e abióticos. No Brasil, a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), é a praga mais importante desta cultura, tendo ampla distribuição nos canaviais do Brasil e em outras localidades no continente americano (VENDRAMIM; SILVA; CAMARGO, 1989). A lagarta faz um túnel vertical dentro do colmo que se torna a principal rota de entrada para microorganismos (OGUNWOLU et al., 1991). Os fungos que causam o complexo broca-podridão, *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium verticillioides* são comumente encontrados nos túneis produzidos por *D. saccharalis*.

A identificação de genes associados com a resposta da cana-de-açúcar à herbivoria é fundamental. Um melhor entendimento da reorganização transcricional e a identificação de genes ativados em resposta ao ataque de sua principal praga, a broca-da-cana, pode servir como ferramenta para melhorar a produção de cana-de-açúcar usando a biotecnologia. Há ainda a possibilidade de usar os genes aqui identificados como marcadores moleculares no melhoramento, já que eles participam, direta ou indiretamente, da resistência contra insetos.

O objetivo geral deste estudo foi identificar e caracterizar genes diferencialmente expressos na resposta de cana-de-açúcar ao ataque de *D. saccharalis* com potencial para

utilização em estratégias biotecnológicas que visam aumentar a resistência de cana-de-açúcar a insetos. Assim os objetivos específicos foram:

- caracterização da expressão gênica de *sugarwin* através do monitoramento da indução dos transcritos ao longo do tempo e em diferentes tecidos. Caracterização da função da proteína, através de buscas por similaridade com outras proteínas de atividade conhecida, localização subcelular, produção da proteína recombinante e efeito sobre parâmetros biológicos de *D. saccharalis* e de fungos.

- identificação de serino proteases e inibidores de serino proteinases diferencialmente expressos pela alimentação de *D. saccharalis* através de macroarranjos de DNA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Respostas induzidas de plantas

Para se defender do organismo invasor, as plantas usam uma variedade de sistemas de defesa que incluem barreiras físicas e químicas pré-existentes e defesas induzidas. Dois processos diferentes estão envolvidos na indução das defesas de plantas à patógenos e herbívoros. Um processo envolve o reconhecimento gene-a-gene. Genes de resistência de plantas reconhecem compostos liberados por insetos ou patógenos e ativam respostas de defesa e resistência específicas para o organismo invasor. O segundo processo envolve o reconhecimento de dano nos tecidos da planta provocado pelo agressor. O dano leva a mudanças na química da planta, seguidas da produção de moléculas de sinalização que desencadeiam uma resposta de estresse generalizada (TURLINGS et al., 2000; DANGL; JONES, 2001; AUSUBEL, 2005; SCHMELZ et al., 2006; SMITH, BOYKO, 2006).

Os processos bioquímicos e fisiológicos que resultam na indução da resistência provavelmente são cadeias de reações envolvendo muitos compostos diferentes (KARBAN; BALDWIN, 1997), portanto, estudos que visam a identificação e caracterização dos genes que codificam as proteínas de defesa podem contribuir para o desenvolvimento de variedades de plantas com maior resistência a pragas e patógenos.

Nos últimos anos tem ocorrido um progresso considerável no conhecimento sobre a regulação gênica durante as respostas induzidas de plantas. As informações geradas com o sequenciamento de genomas e biologia de sistemas contribuirão para a elucidação dos mecanismos que controlam a evolução das interações planta-inseto e planta-patógeno. O entendimento completo das bases moleculares da resistência de plantas e da regulação das respostas de defesa permitirá aos geneticistas e melhoristas usar abordagens mais sofisticadas para controle de pragas e patógenos ao aumentar as defesas naturais das plantas.

As respostas das plantas à injúria podem ser sistêmicas e/ou locais, e, portanto envolvem a geração, translocação, percepção e transdução de sinais específicos para ativar a expressão dos genes de defesa em resposta ao ferimento (LÉON; ROJO; SANCHEZ-SERRANO, 2001). A complexidade de eventos envolvidos na defesa de plantas pode ser demonstrada pela análise do genoma de *Arabidopsis thaliana*. Estima-se que 11,5% do número total de genes estejam envolvidos em defesa, além destes, 10,4% podem estar envolvidos na sinalização (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000).

2.2 Regulação dos mecanismos de defesa

As plantas são constantemente atacadas por uma variedade de estresses bióticos, como insetos herbívoros, nematóides e infestações de fungos, bactérias e vírus, e abióticos ao mesmo tempo (MELLO; SILVA-FILHO, 2002). Cada ataque ativa uma ou várias vias de sinalização para assegurar uma resposta defensiva efetiva no tempo e no espaço. Portanto, as plantas precisam ser capazes de identificar e priorizar cada via de sinalização a fim de montar a estratégia de defesa mais eficaz para minimizar danos correntes e futuros e também para preservar o crescimento vegetativo e sucesso reprodutivo (KARBAN; BALDWIN, 1997; MENOSSI et al., 2008). Os sinais hormonais que navegam do tecido atacado por toda a planta incluem o ácido jasmônico e intermediários da via octadecanóide, etileno e ácido salicílico, entre outros (RYAN; PEARCE, 2001).

A biossíntese do ácido jasmônico é catalisada por várias enzimas conhecidas coletivamente como a via octadecanóide. A produção de vários compostos relacionados com defesa, por exemplo, toxinas, proteínas antinutritivas e antidigestivas, requer a sinalização por octadecanóides, como o ácido 12-oxofitodienóico, ácido jasmônico e metil jasmonato, todos derivados do ácido linolênico (CREELMAN; MULLET, 1997). Vários relatos têm mostrado que a via de sinalização do jasmonato é crucial para proteção contra o ataque de insetos (OROZCO-CARDENAS; MCGURL; RYAN, 1993; BALDWIN, 1998; STOTZ et al., 2000, 2002).

O etileno é um hormônio cuja exposição leva a muitas modificações na fisiologia e bioquímica das plantas, além disso, também está envolvido na indução de defesas (KARBAN; BALDWIN, 1997).

O ácido salicílico é uma molécula de sinalização importante na resistência de muitas plantas à invasão por patógenos. Aumentos nos níveis endógenos de ácido salicílico têm sido associados com a resposta de hipersensibilidade bem como com a resistência sistêmica adquirida. O ácido salicílico também induz a expressão de um conjunto de genes relacionados com a patogênese (SHAH; TSUI; KLESSIG, 1997).

Geneticistas, fisiologistas e ecologistas (THOMMA et al., 1998; REYMOND; FARMER, 1998; MALECK; DIETRICK, 1999; RYAN, 2000; BECKERS; SPOEL, 2006) afirmam que existe uma clara interação (referida pelo termo *cross-talk*) entre as vias de sinalização na regulação da expressão dos genes de defesa. Por exemplo, o ácido salicílico pode inibir tanto a

biossíntese de ácido jasmônico (PEÑA-CORTÉS et al., 1993) quanto a sua percepção (DOARES et al., 1995).

2.3 Uso de *Expressed Sequence Tags*

Técnicas moleculares sofisticadas têm sido aplicadas para o estudo das interações planta-inseto, revelando mecanismos importantes que mediam as defesas diretas e indiretas (BALDWIN et al., 2001). Nos últimos anos houve um rápido aumento do conhecimento sobre genomas de plantas e animais através do seqüenciamento parcial de cDNAs desconhecidos e aleatórios e sua subsequente identificação por meio de buscas no GenBank (CARSON; BOTHA, 2000). Essa metodologia, comumente referida como *Expressed Sequence Tags* ou Etiquetas de Sequências Transcritas (*ESTs*) tem se tornado um modo rápido e eficiente de adquirir informações sobre a expressão gênica em plantas, em particular em espécies cujo genoma ainda não foi seqüenciado.

A partir de projetos *ESTs*, que produziram uma gigantesca quantidade de seqüências gênicas, surgiram técnicas capazes de avaliar os níveis relativos de RNA mensageiro de milhares de genes simultaneamente. Outro aspecto útil dos *ESTs* está no fato de acessar a informação gênica de espécies com um genoma complexo, cujo acesso é difícil usando métodos de genética convencional, como é o caso da cana-de-açúcar (VETTORE et al., 2001).

Projetos visando o seqüenciamento de *ESTs* e de pequenas partes do genoma de cana-de-açúcar foram conduzidos na Austrália, Estados Unidos, África do Sul e Brasil. Austrália e Estados Unidos estão concentrados no mapeamento e aplicação de marcadores moleculares para o melhoramento da cana-de-açúcar, enquanto que a África do Sul está conduzindo um projeto em pequena escala de *ESTs*. No Brasil, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR), hoje Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), financiaram o projeto transcriptoma da cana-de-açúcar (SUCEST – Sugarcane EST Project) (VETTORE et al., 2001).

2.4 Análise em larga escala da expressão gênica

Os organismos respondem a diferentes estímulos por meio de alterações no conjunto de proteínas das células. O fluxo das informações do DNA (genoma) até a síntese de proteínas é intermediado pelo conjunto das moléculas de RNA (transcriptoma). Assim, a concentração de RNA mensageiro de um determinado gene em relação à concentração de RNA mensageiro de um

gene controle é um indicativo do quanto este gene está sendo expresso (PERRET et al., 1998), e, conseqüentemente, um indicativo do quanto a célula está investindo em seu maquinário bioquímico para produzir a proteína codificada por este gene (FELIX et al., 2002).

A disponibilidade da seqüência do genoma e *ESTs* de vários organismos desencadeou o desenvolvimento de métodos eficientes e acurados de análise em larga escala dos níveis relativos de RNA mensageiro. Como resultado, vários métodos foram desenvolvidos baseados em seqüência, como o *Serial Analysis of Gene Expression* (VELCULESCU et al., 1995), *Differential Display Reverse transcription Polimerase Chain Reaction* (HERMSMEIER et al., 2001), fragmentos de DNA (SHIMKETS et al., 1999), ou ainda baseado na hibridização, como por exemplo, bibliotecas subtrativas (SARGENT, 1987), macroarranjos (CHRISTOPHER et al., 2004) e microarranjos (SCHENK et al., 2000).

Os arranjos de DNA são suportes sólidos, comumente de vidro (microarranjo) ou náilon (macroarranjo) aos quais estão fixadas, de forma ordenada, seqüências completas ou parciais de genes (FELIX et al., 2002). O princípio básico por trás da tecnologia é a hibridização de moléculas de DNA das amostras biológicas marcadas radioativamente (macroarranjos) ou com corantes fluorescentes (microarranjos) com as seqüências alvo de DNA imobilizadas em uma superfície sólida (KAZAN et al., 2001). No caso de análise da expressão gênica, os arranjos servem como alvos para hibridização de sondas de cDNA preparadas com amostras de RNA de células ou tecidos. Para comparar a abundância relativa de RNA mensageiro em diferentes tecidos ou estados fisiológicos, o RNA dessas amostras é extraído, convertido em cDNA, marcado com radioativo ou corante fluorescente e hibridizado no arranjo. A quantidade de cada sonda ligada a cada *spot* do arranjo é então quantificada. A razão das intensidades de sinal entre a sonda do cDNA-teste e a sonda do cDNA-controle reflete o estado de expressão (induzido/reprimido) das espécies de RNA mensageiro em estudo.

Em resposta a herbivoria, as plantas redirecionam a síntese de proteínas de crescimento e manutenção celular para a produção de proteínas de defesa, assim, para que isso ocorra, ocorre uma vasta reorganização da transcrição de genes. Vários estudos de monitoramento em larga-escala de transcritos têm revelado as extensivas mudanças ao nível transcricional que se seguem ao ataque por insetos. Por exemplo, Reymond et al. (2000) compararam o perfil de expressão de *A. thaliana* após o ataque de lagartas de *Pieris rapae* e ferimento. Os autores relataram que o ataque de lagartas ativou um conjunto diferente de genes comparado ao ferimento mecânico, e

que alguns genes foram exclusivamente regulados por herbivoria. Em álamo, o ferimento mecânico e a aplicação da secreção oral da lagarta *Malacosoma disstria* ao ferimento mecânico induziram um conjunto similar de genes, com diferenças quantitativas no nível de expressão (MAJOR; CONSTABEL, 2006). Em *A. thaliana*, Cheong et al. (2002) identificaram genes que são regulados por ferimento, patógeno, estresse abiótico e respostas hormonais. Comparando as diferenças de expressão de um inseto generalista e especialista. Reymond et al. (2004) relataram mais de 100 genes responsivos com padrão semelhante de expressão ao ataque dos dois insetos. Rocha et al. (2007) usando microarranjos com seqüências de *ESTs* de cana-de-açúcar, identificaram genes responsivos ao tratamento com metil jasmonato e à herbivoria, entre outros tratamentos.

Com relação aos insetos sugadores de seiva, Kempema et al. (2007) estudaram as mudanças do transcriptoma de *A. thaliana* que seguem à alimentação da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e verificaram que os padrões de expressão são quantitativa e qualitativamente diferentes daqueles observados para insetos mastigadores e para pulgões. Em *Nicotiana attenuata*, Voelckel e Baldwin (2004) usaram uma combinação de técnicas de arranjo para estudar as mudanças transcricionais provocadas por insetos de modos de alimentação diferentes. A resposta de sorgo a pulgões que se alimentam de floema foi estudada por Zhu-Salzman et al. (2004), os autores identificaram uma série de genes regulados pelo ácido jasmônico e ácido salicílico relacionados com defesa, estresse oxidativo e metabolismo secundário.

Enquanto que o monitoramento em larga-escala de transcritos procura caracterizar a interação planta-inseto, propiciando uma visão geral das mudanças transcricionais em resposta a herbivoria, essas técnicas também podem identificar genes com função de limitar a habilidade do herbívoro de digerir e usar nutrientes essenciais de sua planta hospedeira. Usando microarranjos, várias proteínas tóxicas e com função antinutricional foram identificadas na resposta da planta ao ataque por herbívoros, por exemplo, inibidores de proteases, lipoxigenases, peroxidases, quitinases, lectinas (FELTON, 2005; ZHU-SALZMAN; LUTHE; FELTON, 2008).

2.5 Respostas induzidas da cana-de-açúcar a herbivoria

As respostas induzidas caracterizadas em outras espécies de plantas podem estar conservadas em cana-de-açúcar. Na base de dados do SUCEST, segundo a análise comparativa de Falco et al. (2001), foram encontradas proteínas com clara similaridade a inibidores de proteinase,

como o inibidor da tripsina, e o inibidor da cisteína. Em bibliotecas de calo e sementes, foram encontrados inibidores da alfa-amilase, e na maioria dos tecidos foi detectado um inibidor com dupla função, o inibidor da alfa-amilase/tripsina, sugerindo um papel fundamental como mecanismo de defesa. A cana-de-açúcar tem proteínas com alguma similaridade a lectinas, uma classe de proteínas com efeito inseticida observada em plantas leguminosas. Um grande grupo de quitinases e polifenol oxidases também foi encontrado.

Até o momento, a coleção de *ESTs* da cana-de-açúcar gerada pelo SUCEST, proporcionou a identificação de mais de 650 *clusters* de componentes de transdução de sinal (Sugarcane Signal Transduction – SUCAST), com base em análises de similaridade com componentes de transdução de sinal de outras espécies (SOUZA et al., 2001).

Estudos indicam, pela aplicação externa de fitohormônios, que as vias de sinalização do etileno, salicilatos e jasmonatos é conservada em monocotiledôneas como sorgo e cana-de-açúcar (SALZMAN et al., 2005; DE ROSA JR et al., 2005; BOWER et al., 2005; ROCHA et al., 2007). Falco et al. (2001) identificaram através de análises da expressão *in silico* em cana-de-açúcar, vários genes associados com vias de sinalização. Em um estudo com microarranjos de cDNA, o éster do ácido jasmônico, metil jasmonato foi aplicado nas raízes de plantas de cana-de-açúcar (BOWER et al., 2005). Níveis de transcritos aumentaram em genes envolvidos com a transdução de sinal, com a via biosintética de fenilpropanóides, com o estresse oxidativo e com a via biosintética do metil jasmonato.

Em outro estudo com cana-de-açúcar, De Rosa Jr et al. (2005) usando macroarranjos de cDNA, monitoraram os transcritos responsivos à aplicação de metil jasmonato. Quinze genes foram super expressos e 11 foram regulados negativamente, incluindo genes envolvidos na transcrição, sinalização e resposta a estresses (carboxipeptidase, peroxidase, e fator de choque térmico). Através de monitoramento em larga-escala de microarranjos de cDNA correspondendo em sua maioria a elementos de transdução de sinal (SOUZA et al., 2001), foram identificados genes de cana-de-açúcar envolvidos em transdução de sinal, biossíntese de hormônios, fatores de transcrição, genes novos e genes correspondendo a proteínas desconhecidas que são responsivos a aplicação de fitohormônios e fatores bióticos, inclusive a herbivoria (ROCHA et al., 2007).

2.6 Estudo da resposta da cana-de-açúcar ao dano provocado por *Diatraea saccharalis*

A cultura da cana sofre o ataque de inúmeros insetos-pragas, o que é muitas vezes um fator limitante à produção sucro-alcooleira. A broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis* é a praga mais importante da cultura da cana-de-açúcar. É uma praga de difícil controle devido ao seu hábito críptico. As fêmeas depositam seus ovos na face abaxial das folhas. As lagartas, logo após a eclosão, alimentam-se do parênquima, convergindo a seguir para a bainha das folhas, penetram nas gemas laterais e abrem galerias dentro do colmo, onde completam o desenvolvimento larval (VENDRAMIM et al., 1991). O ciclo evolutivo completo é de 53 a 60 dias e podem ter até cinco gerações anuais, dependendo das condições climáticas (GALLO et al., 2002).

Os prejuízos diretos são causados pela abertura de galerias, que ocasionam perda de peso da cana e provocam a morte das gemas. Nas canas novas, a broca produz o secamento dos ponteiros, conhecido como “coração morto”. Os prejuízos indiretos são os mais consideráveis, uma vez que através dos orifícios e galerias penetram fungos que causam a podridão vermelha (*C. falcatum* e *F. verticillioides*) (GALLO et al., 2002). Em lavouras do estado de São Paulo, um nível de ataque de broca de 10% representa uma perda de produção no valor de US\$ 100 milhões por ano, devido somente aos danos indiretos causados pelo complexo de fungos da podridão vermelha (CRUZ; VIANA; WAQUIL, 2005). Os fungos invertem a sacarose armazenada na planta, diminuindo a pureza do caldo e, causando perdas pelo consumo de energia no metabolismo de inversão, diminuindo o rendimento em açúcar e álcool. Além disto, o ataque da broca-da-cana aumenta a susceptibilidade da planta a patógenos, permitindo a invasão de microrganismos através do orifício aberto pela lagarta. No Brasil, os relatos sobre os danos destas doenças fúngicas estão sempre associados aos estudos sobre danos da broca-da-cana (GALLO et al., 2002).

Os enormes prejuízos acarretados pela infestação da broca-da-cana tem levado os cientistas a buscar incorporar características de resistência à esse inseto nos programas de melhoramento, por exemplo, com o uso da transgenia. Exemplos de melhoramento genético usando técnicas de transgenia são conhecidos na literatura, embora ainda não existam cultivares comerciais de cana disponíveis. A maioria das tentativas foram feitas usando genes da toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*. Com o objetivo de aumentar a resistência a brocas que atacam o colmo, Arencibia; Vazquez e Prieto (1997), produziram plantas de cana-de-açúcar pela transformação com uma versão truncada do gene *cryI(A)b* de *B. thuringiensis*, embora a produção de proteína

tenha sido muito baixa, as plantas apresentaram uma leve atividade larvícida. Plantas de cana-de-açúcar resistentes à *D. saccharalis* foram produzidas por Braga et al. (2003), usando uma versão reconstruída de *cryI(A)b* e as plantas apresentaram alta resistência sob condições de estufa e de campo. Weng et al. (2006) usaram uma versão truncada do gene *cryI(A)c* e níveis significativos da proteína e a resistência à broca foram obtidos.

Falco e Silva-Filho (2003) expressaram em cana-de-açúcar os inibidores de tripsina Kunitz e Bowman-Birk de soja, obtendo uma redução no crescimento das lagartas da broca da cana-de-açúcar que se alimentaram das plantas transgênicas, mas não houve aumento da mortalidade.

2.7 Identificação de genes relacionados com defesa: Inibidores de serino proteases

Uma alternativa ao uso de genes organismos filogeneticamente distantes em abordagens transgênicas de resistência a insetos é a utilização dos mecanismos de defesa da própria planta, manipulando a expressão de suas proteínas endógenas de defesa, ou introduzindo genes com efeito inseticida derivados de outras espécies de plantas (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Na busca por mecanismos da própria planta para o controle de fitopatógenos, Soares-Costa et al. (2002) mostrou que a forma recombinante do inibidor de proteinase do tipo cisteína de cana-de-açúcar inibiu o crescimento do fungo filamentosso *Trichoderma reesei*, indicando que esse gene pode também ser empregado para inibir o crescimento de fungos patogênicos à cana-de-açúcar.

Os inibidores de proteases têm um conhecido papel como compostos de defesa das plantas contra invasores. Os estudos dos efeitos de inibidores de proteases adicionados a dietas de insetos começaram nos anos de 1950, quando Lipke et al. (1950) reportaram que uma fração protéica de soja inibia o crescimento e a atividade proteolítica *in vitro* de *Tribolium confusum*. Em 1972, foi documentado que os níveis de inibidores de proteases na planta são normalmente baixos, mas podem aumentar significativamente após o ataque de insetos ou injúria mecânica (GREEN; RYAN, 1972).

Os inibidores de serino proteases mais caracterizados por seu envolvimento na defesa da planta contra herbívoros são: a família I3 do Inibidor Kunitz de tripsina de soja (KUNITZ, 1945); a família I12 dos inibidores de tripsina e quimotripsina, Bowman-Birk (BOWMAN, 1946; BIRK et al., 1963); e a família I20 dos inibidores de batata tipo II e família I13 do tipo I. Outro conjunto de inibidores do tipo serina, caracterizado na defesa contra insetos é o inibidor de proteinase de milho (TAMAYO et al., 2000).

Análises *in silico* mostram que a cana-de-açúcar tem um conjunto conservado de inibidores de protease que podem também estar envolvido na defesa (FALCO et al., 2001; MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003). As serino proteinases têm sido identificadas em extratos do trato digestivo de insetos de muitas famílias, particularmente aqueles da ordem Lepidoptera, e muitas dessas enzimas são inibidas por inibidores de proteinases presentes na dieta (BROADWAY, 1996). A ingestão de inibidores de proteinases de plantas inibe as proteases digestivas do herbívoro, impondo um estresse fisiológico que retarda o crescimento e desenvolvimento e aumenta a mortalidade (JONGSMA; BOLTER, 1997).

2.8 Identificação de genes relacionados com defesa: Proteases

Algumas proteases de plantas são induzidas por herbivoria e têm sido implicadas em defesa contra insetos e (REYMOND et al., 2000; LITTLE et al., 2007). Proteases causam a hidrólise de ligações peptídicas. Para classificação das proteases e inibidores utilizados nesse trabalho foi usada a base de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>; RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006). MEROPS usa uma classificação baseada em esquemas hierárquicos e estruturais, onde fazem parte de uma família aquelas proteases com similaridades estatisticamente significantes em sua sequência de aminoácidos.

As endoproteases hidrolisam ligações internas em uma cadeia polipeptídica, iniciando assim a digestão das proteínas alimentares, gerando sequências com novas partes amino e carboxi-terminais que serão substratos para as exopeptidases completarem o processo. As endopeptidases também processam as proteínas por proteólise limitada. A remoção de peptídeos sinais das proteínas secretadas e a maturação de proteínas precursoras são dois exemplos de proteólise limitada (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006). As exoproteases são classificadas em aminopeptidases, carboxipeptidases, dipeptidil-peptidases, peptidil-dipeptidases, tripeptidil-peptidases e dipeptidases, enquanto que a classificação das endopeptidases é baseada no grupo químico responsável pela catalização da hidrólise da ligação peptídica, que pode ser de seis famílias conhecidas até agora: serina, treonina, cisteína, glutamato e metaloproteases. O termo protease inclui endopeptidases e exopeptidases, enquanto que o termo proteinase é usado para descrever somente endopeptidases.

As plantas são equipadas com uma potente máquina proteolítica que regula irreversivelmente o destino das proteínas (VAN DER HOORN; JONES, 2004). Enquanto que

processos fisiológicos como quebra de proteínas de reserva durante a germinação de sementes, a mobilização de proteínas demandada pela senescência das folhas e a translocação de reservas de nitrogênio para órgãos reprodutivos (RYAN; WALKER-SIMMONS, 1981) têm sido por muito tempo relacionados como função das proteases, somente recentemente a importância da degradação seletiva de proteínas para a regulação de todos os aspectos de desenvolvimento de plantas tem sido considerada (SCHALLER, 2004). Desde 1995, suspeita-se que a proteólise regulada está direta ou indiretamente envolvida na maioria dos processos celulares (CALLIS, 1995). Exemplos incluem a via de ubiquitinação/proteassoma (VIERSTRA, 2003), modificação, controle da meia-vida de proteínas, transporte, processamento de pró-proteínas e a regulação da atividade de proteínas (SCHALLER, 2004).

Além de seu papel essencial na regulação de processos fisiológicos, o papel das proteases na defesa de plantas é uma área emergente. Poder-se-ia formular a hipótese que, quando as plantas são atacadas por bactérias, fungos, nematóides, etc, a degradação de proteínas do organismo invasor tem função importante (SHINDO; VAN DER HOORN, 2008). Outra função pode ser na percepção do invasor. Ao ser ativada por elicitores, a protease pode ativar componentes de sinalização pela clivagem proteolítica (VAN DER HOORN; JONES, 2004). Um exemplo desse caso é encontrado em animais, em *Limulus polyphemus*, a serino protease fator C torna-se ativada com a ligação de lipopolissacarídeos derivados de patógenos, ativando uma cascata proteolítica que resulta na resposta de defesa (ARIKI et al., 2004). Cabe especular se similar via de ativação de resposta de defesa encontra-se conservada em plantas.

Van der Hoorn e Jones (2004) sugeriram também que as proteases podem executar a resposta de defesa, diretamente degradando as proteínas do invasor, liberando toxinas, ou ativando enzimas de suas formas precursoras. Esses autores propõem que as proteases que se acumulam em altos níveis no local da invasão podem ser candidatas a esse papel.

As plantas produzem proteínas de defesa que limitam a habilidade de aquisição de nutrientes e outros aspectos da fisiologia digestiva do inseto, algumas proteases induzidas por ferimento, insetos, ou patógenos podem também funcionar como substâncias anti-nutritivas. Muitas cisteíno proteases do tipo papaína (RCR3, papaína, Mir1, RD21) têm sido envolvidas com a defesa de plantas contra insetos (KRÜGER et al., 2002; KONNO et al., 2003; PECHAN et al., 2000, 2002). Em milho, Pechan et al. (2000) mostraram a acumulação de uma cisteíno protease de 33 kDa em resposta ao ataque de insetos lepidópteros. Lagartas que se alimentaram de milho

transformado com o gene que codifica essa protease, *mir1*, tiveram seu crescimento reduzido em até 80% e, através de microscopia eletrônica de varredura, foi mostrado que a membrana peritrófica foi severamente danificada (MOHAN et al., 2006).

Uma metaloprotease, a leucino aminopeptidase ácida (LapA), se acumula em folhas de tomate seguido de ferimento mecânico, alimentação de inseto mastigador, em resposta a infecção por certos patógenos e à aplicação de ácido jasmônico (PAUTOT et al., 1993, 2001; CHAO et al., 1999). Embora a indução gênica e propriedades bioquímicas da LapA sejam conhecidas, sua função ainda é desconhecida.

Em tomate, a treonina deaminase é uma enzima que possui duas funções, uma no metabolismo primário e outra na defesa (CHEN et al., 2005, 2007). A expressão da treonina deaminase nas folhas é ativada pela via de sinalização do jasmonato em resposta ao ataque de lagartas de *Manduca sexta*. A proteína se acumula no intestino médio e fezes do inseto. Chen et al. (2005) mostraram que a arginase e treonina deaminase atuam no intestino médio de *Manduca sexta* para catabolizar os aminoácidos essenciais arginina e treonina, respectivamente. A LapA e a arginase podem atuar em conjunto, a LapA pode liberar arginina da parte N-terminal de peptídeos (CHAO et al., 1999), e pode agir, junto com a arginase (CHEN et al., 2005) para diminuir a disponibilidade de aminoácidos no trato digestivo.

2.9 Serino proteases e defesa de plantas

Os melhores exemplos do provável envolvimento de serino proteases na defesa são as subtilisinas, família S8, também conhecidas como família subtilase. Esta é a segunda maior família de serino peptidases, em termos de número de seqüências e peptidases caracterizadas, sendo que em primeiro lugar está a família S1, da quimotripsina (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006). Tornero; Conejero e Vera (1996), estudando uma proteína com repetições ricas em leucina (LRP) que se acumula em tomate, seguida da infecção por patógenos, sugeriram que a LRP é processada por proteases com a ação das P69 (que percentem à família das subtilisinas). Há ainda trabalhos que sugerem que a família das subtilisinas age como convertases, liberando compostos de sinalização intermediários, com funções das mais diversas, como na regulação de densidade de estômatos (BERGER; ALTMANN, 2000) na formação da epiderme de embriões (TANAKA et al., 2001), e na fragmentação e liberação de inibidor de proteinase do tipo tripsina de um precursor maior (HORN et al., 2005).

Em tomate, uma serino carboxipeptidase (família S10) foi demonstrada como induzida por ferimento, sistemina e metil jasmonato (MOURA; BERGEY; RYAN, 2001). O envolvimento de serino proteases na sinalização de defesa de plantas tem sido mostrado indiretamente por estudos que envolvem inibidores de serino proteases (SASABE et al., 2000). No entanto, van der Hoorn e Jones (2004) sugeriram cautela na interpretação de estudos que usam inibidores de serino proteases, pois a inibição não é completamente específica.

Sistemina, um peptídeo sinal de plantas, é sintetizada na forma de um precursor chamado de pró-sistemina (PEARCE et al., 1991; RYAN; PEARCE, 2003). Na ocasião de um ferimento, a pró-sistemina é processada por proteinases, provavelmente uma subtilase (SCHALLER; RYAN, 1994). O sinal da sistemina é percebido e desencadeia uma série de modificações que culmina com a ativação de genes de defesa (RYAN; MOURA, 2002; BROWSE; HOWE, 2008).

Estudos conduzidos por Marcia O. Mello, do “Laboratório de Biologia Molecular de Plantas” possibilitaram a identificação de 193 *clusters* de proteases em cana-de-açúcar, que foram separados em várias famílias baseados em estudos filogenéticos (MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003). Esses estudos serviram como passo inicial para investigar o envolvimento de serino proteases de cana-de-açúcar na defesa. A localização subcelular de proteases induzidas por herbivoria, por exemplo, pode elucidar a co-localização de possíveis substratos e sugerir funções específicas (BEERS et al., 2000). Ainda não há estudos desse tipo com serino proteases, no entanto, para outras famílias de proteases há vários relatos que relacionam a localização subcelular com seu papel provável na defesa. Xia et al. (2004) mostraram que CDR1 se acumula no fluido intracelular em resposta à colonização de patógenos. RD21, uma cisteíno protease do tipo papaína, é encontrada nas vesículas (corpos de retículo endoplasmático) em *A. thaliana* (MATSUSHIMA et al., 2002). Essas estruturas se acumulam em resposta ao ferimento e ataque de insetos e podem estar envolvidos com defesa. A papaína (AZARKAN et al., 2006), e MIR1 (PECHAN et al., 2000), são produzidos como pré-proteínas, o que sugere que elas são secretadas ou localizadas em vesículas. RCR3 (REQUIRED FOR *Cladosporium* RESISTANCE-3), uma protease do tipo papaína de tomate (KRÜGER et al., 2002) foi o primeiro gene de protease envolvido na resistência a doenças. RCR3 é requerida para a função de Cf-s, um gene de resistência que media o reconhecimento de AVR2 do patógeno *C. fulvum*. A localização no apoplasto de RCR3, juntamente com a alta especificidade da interação com Cf-2 sugere que essa proteína pode mediar a percepção de AVR2.

2.10 Identificação de genes relacionados com defesa: Genes induzidos por dano ou *win* (*wound inducible*)

Vários genes que codificam proteínas induzidas por dano ou *win* foram identificados em inúmeras espécies de plantas. As primeiras proteínas *win* incluem os inibidores de proteinase I e II de batata e tomate (GREEN; RYAN, 1972; PEÑA-CORTÉS et al., 1989). Também em batata, o ferimento induz dois genes específicos organizados em tandem, *win1* e *win2* (STANFORD; BEVAN; NORTHCOTE, 1989). No látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) existe uma proteína abundante chamada heveína (BROEKAERT et al., 1990) que tem similaridade às proteínas *win1* e 2 de batata. A estrutura dessa proteína é a seguinte: uma sequência sinal para direcionamento à via secretória, um domínio de ligação à quitina na parte amino-terminal rico em resíduos de cisteína, uma região espaçadora, um domínio carboxi-terminal chamado barwin e uma sequência de direcionamento para o vacúolo (Figura 1A). O domínio N-terminal da heveína, de ligação à quitina, pode ser classificado como o domínio lectina, cuja função está estabelecida (PEUMANS; VAN DAMME, 1995), enquanto que a função ainda não foi identificada para o domínio C-terminal. Várias proteínas com estrutura similar à da heveína foram identificados em outras espécies de plantas, por exemplo, CPB20 em tabaco (PONSTEIN et al., 1994), SN-HLPf em *Sambucus nigra* (VAN DAMME et al., 1999), PN-AMP1 e 2 em *Pharbitis nil* (KOO et al., 1998), HEL (*hevein-like*) em *Arabidopsis* (POTTER et al., 1993) entre outras proteínas.

As proteínas da família das heveínas são induzidas por fungos e inibem o seu crescimento (VAN PARIJS et al., 1991; POTTER et al., 1993). Em *A. thaliana*, foi mostrada a indução de transcritos do homólogo da heveína por insetos de diferentes ordens e com diferentes modos de alimentação: lagartas de *P. rapae* (REYMOND et al., 2000), oviposição de espécies de *Pieris* (LITTLE et al., 2007), alimentação da mosca-branca *Bemisia tabaci* (KEMPEMA et al., 2007) e alimentação do pulgão *Myzus persicae* (MORAN et al., 2002). Em tomate, Chen et al. (2007) identificaram mais de 20 proteínas estáveis nas fezes de lagartas de *Manduca sexta*, incluindo proteínas induzidas por jasmonato e ferimento e proteínas relacionadas com patogênese (PR), entre essas proteínas os autores mencionam a proteína PR P2 (PR4). Essa proteína é o homólogo da heveína de tomate. A estabilidade desse homólogo no trato digestivo possivelmente pode ser consequência da ligação do domínio lectina presente na heveína, com a quitina da membrana peritrófica do inseto.

Figura 1 – Comparação da estrutura organizacional dos membros da família das Heveínas (A) e membros da família Barwin (B)

Outras proteínas de plantas apresentam similaridade estrutural somente com a parte carboxi-terminal da heveína e das proteínas *win* de batata. Essas proteínas não possuem o domínio de ligação à quitina, tampouco a sequência de direcionamento ao vacúolo em sua estrutura (Figura 1B). Assim, todas as proteínas que apresentam similaridade somente com o domínio carboxi-terminal da proteína heveína pertencem à família Barwin. Uma característica estrutural conservada entre as proteínas da família Barwin é a presença do peptídeo sinal para a via secretória e de um domínio com seis resíduos de cisteína envolvidos na formação de pontes disulfeto. Vários homólogos foram isolados de plantas: em tabaco, a proteína relacionada com patogênese PR4 (FRIEDRICH et al., 1991), em tomate P2 (LINTHORST et al., 1991); barwin foi isolada de cevada (SVENSOON et al., 1992), wheatwins de trigo (CARUSO et al., 1999), WjAMP-1 de *Wasabia japonica* (KIBA et al., 2003), ZmPR4 de milho (BRAVO et al., 2003), OsPR4 e OsPR4b de arroz (AGRAWAL et al., 2003; ZHU; SONG; ZHENG, 2006) entre outras.

Embora o domínio barwin ainda não tenha função caracterizada, as proteínas da família Barwin são associados à resposta de plantas à infecção por fungos, como foi mostrado em tabaco para *Cladosporium fulvum* (LINTHORST et al., 1991), em cevada para *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (HEJGAARD et al., 1992), em trigo para *F. culmorum* (CARUSO et al., 1999), em milho para *F. verticillioides* (BRAVO et al., 2003), e em arroz para *Rhizoctonia solani* (ZHU; SONG; ZHENG, 2006).

2.11 Proteínas do tipo barwin em cana-de-açúcar

O conhecimento sobre genômica da cana-de-açúcar é muito inferior ao conhecimento acumulado com outras plantas monocotiledôneas que já tiveram seu genoma sequenciado total ou parcialmente, como o arroz, trigo e milho. Com o advento do SUCEST (VETTORE et al., 2001, 2003), a pesquisa por genes de cana com homologia a outros previamente caracterizados ficou facilitada. Dentre as seqüências do SUCEST, foram identificados vários genes homólogos envolvidos com resposta a insetos herbívoros (FALCO et al., 2001), incluindo um homólogo de cana com alta similaridade de seqüência ao domínio barwin de cevada (FALCO et al., 2001). Esse gene foi nomeado de *sugarwin* (*sugarcane wound-induced*). Além disso, e provavelmente devido à complexidade do genoma de cana, foi constatado que existem duas isoformas chamadas de *sugarwin1* e *sugarwin2*.

Pompermayer (2004) mostrou que a alimentação da broca-da-cana induz a expressão de uma série de genes, entre eles a lipoxigenase, polifenol oxidase, cistatina, metalotioneína e *sugarwin*. Após a caracterização da expressão gênica foi feita a clonagem da região promotora de *sugarwin*. O pedido de patente do promotor desse gene induzido por herbivoria foi feito junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, o qual recebeu o protocolo número 027430. Os resultados de expressão gênica de *sugarwin* serviram como material comprobatório da indução do promotor de *sugarwin* pela herbivoria.

Assim, o dano provocado pela broca induz a expressão de uma série de genes, que podem ter um papel na defesa da planta. A identificação da indução de um homólogo de barwin em cana-de-açúcar por um inseto é a primeira documentação de uma proteína do tipo barwin induzida por herbivoria.

Homólogos de barwin foram identificados em várias espécies e estão correlacionados com a infecção por patógenos. O modo de ação da proteína barwin ainda não foi elucidado, mas há

estudos que mostram atividade anti-patogênica. Torna-se necessário uma caracterização da indução da expressão desse gene, para fornecer subsídios que possam elucidar sua função em cana-de-açúcar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plantas, insetos e tratamentos para caracterização de *sugarwin*

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Genética, ESALQ-USP. Microtoletes de cana-de-açúcar com uma gema, cultivar SP80-3280 gentilmente cedidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, foram plantadas em copos plásticos de 200mL contendo substrato (Plantmax, Eucatex) e cultivados em casa-de-vegetação por 20 dias sob condições naturais, sem suplementação de luz artificial. A temperatura variou 18°C (noite) a 34°C (dia).

Para avaliar a resposta da planta de cana ao ataque por *D. saccharalis*, o experimento consistiu de três tratamentos: plantas controle, plantas submetidas ao ataque de *D. saccharalis* e plantas onde foi feito ferimento mecânico. Foram utilizadas lagartas criadas no CTC em dieta artificial (KING; HARTLEY, 1985) a 25°C e 60±10% umidade relativa com fotofase de 14 h. As lagartas de 4º instar foram retiradas da dieta e mantidas sem alimentação por 24 h antes de serem transferidas individualmente para a região do colmo da planta de cana-de-açúcar. Cada lagarta foi monitorada por 30 minutos e descartada se falhou a se alimentar da planta. Depois de aproximadamente uma hora, a maioria das lagartas entrara no colmo da planta de cana. No tratamento ferimento mecânico, o colmo da planta foi ferido com uma pinça fina, de hora em hora, durante 12 h. O material vegetal de quatro plantas foi coletado, e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, nos seguintes intervalos: antes do início do experimento (0h), 6 h, 12 h, e 24 h após. Três repetições de quatro plantas cada foram usadas para cada tempo de coleta.

Para avaliar a resposta da planta de cana-de-açúcar à inoculação por fungos, isolados de *F. verticillioides* e *C. falcatum* foram fornecidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira, sob responsabilidade da Dra. Cassiara Regina N. C. B. Gonçalves. Culturas foram iniciadas inoculando placas com meio BDA (batata-dextrose-ágar) com micélio do fungo e incubando as placas a 25°C com fotofase de 12 h. Para obtenção de conídios, discos de micélio foram transferidos para ADA (aveia-dextrose-ágar) e as placas foram incubadas a 25°C com fotofase de 12 h. Os conídios foram obtidos de culturas de 2 semanas de idade, deslocando-os do micélio em água destilada estéril, com a ajuda de alça de Drigalski. A concentração da mistura de esporos de *F. verticillioides* e *C. falcatum* foi ajustada para 1×10^4 esporos/mL. O ferimento mecânico para a abertura do local onde 100 µL da suspensão de esporos foi inoculado, foi feito com uma pinça fina, no início do experimento. O material vegetal de quatro plantas foi coletado, e imediatamente

congelado em nitrogênio líquido, nos seguintes intervalos: antes do início do experimento (0h), 6 h, 12 h, e 24 h após. Três repetições de quatro plantas cada foram usadas para cada tempo de coleta.

Para os experimentos acima, o tecido vegetal foi separado entre local (correspondendo à região de aproximadamente 2 cm do colmo da planta, ao redor do local onde ocorreu o dano) e sistêmico (tecido da bainha e limbo foliar acima do local de dano provocado pela lagarta e não atacados pela mesma) (Figura 2).

Na avaliação da resposta ao tratamento de plantas de cana-de-açúcar com os hormônios de planta metil jasmonato e metil salicilato, plantas de 20 dias de idade foram pulverizadas até o ponto de escoamento com uma solução preparada na hora de 0,2 mM de Metil Jasmonato (MJ) (Bedoukian Research Inc., Danbury, CT) ou 5 mM de metil salicilato (Sigma-Aldrich) em 0,02% etanol em 0,125% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). As plantas controle foram pulverizadas com a mesma solução sem os hormônios. Plantas controle e tratamento foram incubadas em uma caixa plástica fechada hermeticamente contendo um frasco aberto com 10 N NaOH (que serviu como uma armadilha para o CO₂ gerado, HOWE et al., 1996). A parte aérea das plantas (sem divisão entre local e sistêmico) foi coletada e imediatamente congelada em nitrogênio líquido nos tempos 0, 4, 8 e 12 h depois de pulverizar com metil jasmonato e nos tempos 0, 6, 48 e 72 h depois de pulverizar com metil salicilato. Três repetições de quatro plantas cada foram usadas para cada tempo de coleta.

Figura 2 - Plantas de 20 dias de idade de cana-de-açúcar. No lado esquerdo está uma planta atacada pela broca-da-cana, e do lado direito uma planta não atacada. Para estudos de expressão gênica em resposta ao ataque da broca, ferimento e aplicação de esporos de fungo, o tecido foi separado entre região local e sistêmica. A região local é onde o ferimento ocorreu (no detalhe é mostrado o ferimento provocado pela broca-da-cana, a barra branca representa 1 cm). A região sistêmica compreende toda a parte aérea da planta acima dos 2 cm da região local

3.1.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total de cana-de-açúcar foi extraído com TRIZOL® Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, seguida por remoção de ácido desoxiribonucléico por tratamento com 2 unidades de DNase I, Rnase free (Fermentas, EN0521) por 20 min a 37°C. Para remover traços de DNA e DNase que possam interferir com a quantificação, depois do tratamento com DNase, o RNA total foi re-extraído com TRIZOL. O RNA total foi quantificado por leitura no espectrofotômetro a 260 nm e a integridade checada através de gel de agarose. A síntese de cDNA de primeira fita foi feita em um volume de 20 µL, contendo 2 µg de RNA total, 2,5 µM de poly-(dT) primer e 1µL de transcriptase reversa seguindo-se as instruções do fabricante (Improm-II™ Reverse Transcriptase, Promega, Madison, WI).

3.1.2 Monitoramento dos transcritos através de PCR em tempo real e análise dos resultados

O PCR quantitativo foi executado com a máquina Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) e com o reagente SYBR Green I (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen). Iniciadores gene-específicos foram desenhados com o *software* OligoPerfect™ (Invitrogen) usando o seguinte conjunto de critérios: tamanho de 20 a 22 nucleotídeos, conteúdo de guanina e citosina (GC%) entre 40 a 70% e tamanho de produto entre 100 e 270 pares de bases. A especificidade dos primers foi confirmada por análise dos produtos amplificados em gel de agarose 2%, por análise da curva de desnaturação e através de clonagem dos produtos de PCR no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen), e seqüenciamento seguido de checagem por Blastx (ALTSCHUL et al., 1997). Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β-actin foram usados como controles internos e mostraram o mesmo padrão de regulação. Para todos os experimentos, o GAPDH foi escolhido como controle interno. Os genes do GAPDH e RNAr 25S foram descritos como bons genes de referência para avaliar tecidos e genótipos de cana-de-açúcar (ISKANDAR et al., 2004). Os acessos no GenBank usados para desenhar os iniciadores para *IPBB*, *sugarwin1*, *sugarwin2* e *GAPDH* foram AY093805 (SCQGRT3045E08.g), CA145787 (SCVPRT2073C10.g), CA138924 (SCEQRT2091D12.g) e CA301409 (SCCSD2C04G07.g), respectivamente. As seqüências dos iniciadores usados para PCR em tempo real encontram-se no APÊNDICE 1. No APÊNDICE 2 encontram-se as seqüências dos fragmentos amplificados.

A reação de PCR continha 4 µL do cDNA, 10 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 5,2 µL de água destilada e 0,2 µM de cada iniciador em um volume

final de 20 μ L. Reações controle sem molde foram feitas com 4 μ L de água. As condições da PCR foram as seguintes: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min, e 35 ciclos de 95°C por 15 seg e 62°C por 30 seg. O sinal de fluorescência foi gravado no final de cada ciclo e a análise da curva de desnaturação foi feita de 72 a 99°C.

A análise dos dados foi feita usando correção para eficiência dos iniciadores, através do software *Relative Expression Software Tool - 384* (REST-384© - version 1) (PFAFFL, 2001), (<http://rest.gene-quantification.info/>). A expressão do GAPDH foi usada para normalizar o nível de transcritos de cada amostra.

3.1.3 Localização subcelular de SUGARWIN1 e 2

O programa SignalP (BENDTSEN et al., 2004) foi usado para prever o sítio de clivagem entre o peptídeo sinal e a proteína madura. Os iniciadores foram desenhados para conter sítios de restrição para clonagem no vetor EN50PMA4- β K-GFP (ZHAO; MORIAU; BOUTRY, 1999) (as seqüências dos iniciadores usados na clonagem do peptídeo sinal encontram-se no APÊNDICE 3). O fragmento contendo a seqüência de direcionamento foi amplificado por PCR a partir de cDNA do experimento onde o RNA total de cana-de-açúcar foi coletado 24 h após o ataque de lagartas de *D. saccharalis*. O plasmídeo pBIN 35S-mGFP5 (HASELOFF et al., 1997), foi usado como um controle para a localização de gfp no retículo endoplasmático. As construções pBIN 35S-mGFP5, SUGARWIN1::GFP, e SUGARWIN2::GFP foram distribuídas dentro de células de epiderme de cebola usando bombardeamento de partículas de tungstênio seguindo protocolo de Lukaszewicz et al. (1998) com algumas modificações: 10 μ g de DNA plasmidial, 10 μ L de 0,1 M de espermidina (Sigma) e 25 μ L de solução de 2,5 M CaCl_2 (Merck) foram usadas. As partículas foram bombardeadas nas células usando o PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System (Bio-Rad) com discos de ruptura de 1100 psi sob uma pressão de 28 polegadas de Hg. A distância até o alvo foi de 6 cm. Depois do bombardeamento, as células foram deixadas por 18 a 22 h a 25°C sob luz contínua. As epidermes ficaram por 4 h em 20 mM MOPS (pH 7) para visualização da gfp na parede celular (SCOTT et al., 1999) e submetidas à plasmólise por 10 min com 0,5 M mannitol antes da visualização. A microscopia de fluorescência e de contraste diferencial de interferência (DIC) foram feitas usando o Zeiss Axiovert® 100M equipado com lentes de imersão em água 25X e 40X e óleo 100X (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA).

3.1.4 Expressão heteróloga de SUGARWIN em *Escherichia coli*

A fase aberta de leitura das duas isoformas de SUGARWIN de cana-de-açúcar foi obtida por amplificação de cDNA de cana-de-açúcar proveniente da extração de RNA total de plantas de cana 24 horas após infestação com *D. saccharalis*. Para produção da proteína recombinante, somente foi considerada a proteína madura, sem o peptídeo sinal. Os iniciadores foram desenhados para conter a sequência de nucleotídeos correspondente aos oito primeiros e últimos sete aminoácidos da proteína, com os sítios de restrição de enzima incorporados. Para o desenho dos primers também foi levado em consideração o uso de códons de *E. coli*, alguns códons foram alterados a fim de que haja um suprimento maior de tRNA e, por conseguinte, uma produção correta e eficiente da proteína recombinante (a sequência dos iniciadores encontra-se no ANEXO 4). SUGARWIN1 foi clonada nos sítios NdeI e XhoI do vetor pET28b (Novagen) e expressa na cepa de *E. coli* BL21.

Para aumentar a solubilidade da proteína, foi testada a estratégia de produção de SUGARWIN2 em cepa Origami, para isso foi feita a clonagem no vetor de expressão pET32a. Esse vetor tem uma etiqueta de tioredoxina (Trx-Tag), a tioredoxina é um polipeptídeo altamente solúvel que pode aumentar a solubilidade das proteínas alvo. Além disso, parece catalisar a formação de pontes dissulfeto no citoplasma de cepas com a mutação *trxB* (tioredoxina redutase) (STEWART; ASLUND; BECKWITH, 1998). A combinação de vetores contendo etiquetas de tioredoxina (Trx-Tag) e cepas com as mutações *trxB/gor* (cepa Origami) que promovem formação de pontes dissulfeto no citoplasma prometem produzir altos níveis de proteínas alvo solúveis e propriamente montadas. Os nucleotídeos correspondentes à proteína madura de SUGARWIN2 foram clonados entre os sítios NcoI e XhoI do vetor pET32a e expressa na cepa de *E. coli* Origami. O vetor pET32a e a cepa Origami foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Flavio Henrique da Silva, da UFSCar.

O fragmento amplificado por PCR foi clonado em fase de leitura no vetor pET (Novagen) para expressão de uma proteína recombinante com cauda de Histidinas N-terminal. Na reação de 50 µL de PCR, foram usados 1 µL do molde (cDNA), 200 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1X PCR buffer, 1,5mM MgCl₂, 0,2 µmol de cada primer e 1U de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). O protocolo de PCR consistiu de um ciclo inicial com uma temperatura de 95°C por 3 min, seguido por 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C, 50 seg a 72°C e um último passo com temperatura de 72°C por 3 min.

As construções foram inicialmente transformadas na cepa de *E. coli* DH5 α e selecionadas em placas de LB canamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) para permitir a estabilização dos plasmídeos. Uma vez estabelecidos no hospedeiro DH5 α , os vetores foram transferidos para a cepa de *E. coli* escolhida.

Para a produção da proteína recombinante, uma colônia isolada de células transformadas foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB) contendo o antibiótico apropriado e crescida a 37°C sob 200 rpm de agitação durante 18 h. A pré-cultura foi inoculada em meio LB contendo os antibióticos apropriados na razão de 1:100 do volume da cultura total a ser produzida e incubados sob agitação a 37°C até a densidade óptica atingir 0,6. As células bacterianas foram induzidas com isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) em uma concentração final de 1 mM. A cultura foi incubada a 37°C por 4 h. As células foram centrifugadas e o precipitado ressuspensionado em 50 mL de 20mM Tris-HCl, pH 8.0 e congelado a -80°C. Para a lise bacteriana, o precipitado foi tratado com lisozima (100 $\mu\text{g/mL}$) e inibidores de proteinase: PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) (100 $\mu\text{g/mL}$), leupeptina (0,5 $\mu\text{g/mL}$), aprotinina (1 $\mu\text{g/mL}$), pepstatina (1 $\mu\text{g/mL}$) e 1 tablete de inibidor de proteinase (Roche) e incubado por 1 h sob agitação à temperatura ambiente. Após esse período, foi tratado com DNase (20,000 U/mL) e RNase (10mg/mL) e incubado por mais 30 m sob agitação à temperatura ambiente. Foi feita uma centrifugação a 15,000 rpm por 20 m a 4°C. Para purificação em condições não-desnaturantes (proteína solúvel) foi usado o sobrenadante dessa centrifugação.

A purificação da proteína recombinante foi feita por cromatografia de afinidade usando a resina de níquel Ni-NTA superflow (Qiagen) previamente equilibrada com o tampão de lise. Para purificação da fração solúvel é usado o sobrenadante da centrifugação. A coluna foi equilibrada com 10 volumes de coluna de tampão de lise (20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH 8). A fração solúvel foi aplicada na coluna com um fluxo aproximado de 1 gota por segundo. Após, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna do mesmo tampão com 20mM de imidazole. A proteína foi eluída com o 5 mL do tampão com 250mM de imidazole e 5 mL do tampão com 500mM de imidazole.

Para purificação da fração insolúvel em condições desnaturantes, o precipitado da centrifugação foi ressuspensionado em 15 mL de tampão de lise (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8M uréia pH 8) e mantido sob agitação por 1 h, depois centrifugado a 10,000 x g por 20m a 25°C, o sobrenadante dessa segunda centrifugação foi usado para purificação. A coluna foi equilibrada com 10 volumes do tampão de lise (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8M uréia pH 8,0). A

fração insolúvel foi aplicada e a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de lavagem (mesmo tampão com pH 6,3), depois eluída em duas etapas: com 15 mL tampão pH 5,9 e com 15 mL de tampão pH 4,5.

As amostras foram dialisadas extensivamente contra 25mM de bicarbonato de amônia (pH 8,0) e posteriormente liofilizadas. A expressão e purificação da proteína recombinante foi monitorada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

Para eliminar a porção N-terminal da SUGARWIN2 recombinante foi feita a digestão da proteína com a Endoproteínase Glu-C (Roche). A protease hidrolisa as ligações peptídicas da parte C-terminal do aminoácido glutamato (Glu), assim o primeiro aminoácido da proteína madura ficaria exposto. Procedeu-se a digestão, segundo as recomendações do fabricante, e após oito horas de digestão a solução protéica foi liofilizada e ressuspensa em água. A eficiência da digestão foi monitorada por SDS-PAGE. A proteína digerida foi usada em testes de inibição da germinação de esporos de fungos.

3.1.5 Teste do efeito de SUGARWIN1 no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *D. saccharalis*

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - (ESALQ), da Universidade de São Paulo, com a ajuda da técnica de laboratório Neide G. Zério. Lagartas de *D. saccharalis* foram mantidas em dieta artificial (KING; HARTLEY, 1985) com fotofase de 14 h a $25\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ e $60\% \pm 10\%$ umidade relativa. Para determinar o efeito da proteína recombinante SUGARWIN1 no crescimento e desenvolvimento de *D. saccharalis*, lagartas recém-eclodidas foram transferidas para frascos individuais com dieta suplementada com 10 e 20 ppm de SUGARWIN1 recombinante. Os parâmetros analisados foram: tempo de desenvolvimento lagarta-pupa e peso médio de pupas.

3.1.6 Teste de inibição de crescimento de fungos filamentosos

Isolados dos fungos *F. verticillioides* e *C. falcatum* foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) a 25°C . Seguindo metodologia descrita em Zhu, Song e Zheng (2006), discos de micélio com 1 cm de diâmetro foram colocados no centro das placas de 9 cm de diâmetro com BDA e incubados a 25°C . Quando as colônias atingiram 2,5 cm de diâmetro, discos

de papel filtro de 1 cm de diâmetro foram colocados nos bordos de crescimento e a solução teste foi adicionada. A percentagem de solubilidade da proteína em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) foi calculada como 10% através de análise por SDS-PAGE (dados não mostrados). Partindo de uma solução 2000 µg/mL de SUGARWIN1 em PBS, foram aplicados 100 µL do sobrenadante da centrifugação dessa solução aos discos de papel. Assim, a concentração total da proteína no disco de papel era de 20 µg. O tampão PBS foi usado como controle. As placas foram incubadas a 25°C por dois dias. O experimento foi repetido três vezes.

3.1.7 Teste de inibição de germinação de esporos de fungos filamentosos

Esporos de *F. verticillioides* e *C. falcatum* foram obtidos de cultura em meio ADA (aveia-dextrose-ágar) incubando a 25°C com fotofase de 12 h. Os conídios foram obtidos de culturas de 2 semanas de idade, deslocando-os do micélio com alça de Drigalski de vidro em água destilada estéril. A concentração de esporos foi ajustada para 2×10^4 esporos/mL de meio BDB (batata-dextrose-broth) com 1000 U/mL de penicilina e 50 mg/mL de streptomicina. A densidade óptica de culturas em placas de 96 poços foi usada como um indicativo de germinação de esporos. O método de Koo et al. (1998) foi seguido com as seguintes modificações: em placa de 96 poços estéril, foram adicionados 80 µL da suspensão de esporos e 20 µL da solução-teste. Para cada espécie de fungo, foram usados três tratamentos: (1) 200 µg/mL de SUGARWIN2 previamente digerida; (2) 200 µg/mL do vetor vazio previamente digerido; (3) água estéril. A placa foi mantida no escuro a 25°C e a germinação de esporos e o crescimento de micélio foram monitorados através de leitura no espectrofotômetro (595 nm). A comparação da percentagem de germinação de esporos na presença de SUGARWIN2 e do vetor vazio foi feita tomando-se como valor máximo (100%) o valor de absorbância dos fungos na presença de água em relação ao valor de absorbância dos fungos na presença da proteína. Essa relação foi feita para cada ponto de amostragem: 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 h depois da inoculação,

3.2 Macroarranjos contendo seqüências de serino proteases e inibidores de serino proteases de cana-de-açúcar

Foram feitas buscas no SUCEST por clones com similaridade a serino-proteases e inibidores de proteases descritas em outras espécies. A construção do macroarranjo foi feita pelo Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (*Brazilian Clone Collection Center, BCCC*), a partir de 248 clones escolhidos do SUCEST, onde as serino proteases constituíam 81%, enquanto que os inibidores de proteases representam 13% dos clones. Os restantes 6% dos clones eram representados na membrana por genes de referência, como β -actina, GAPDH, fator de iniciação eucariótico e ubiquitina.

O macroarranjo foi espotado em seis membranas de nitrocelulose. O padrão de espotagem seguiu um arranjo 3 x 3, com cada sub-arranjo contendo dois clones colocados em quadruplicata, mais um local vazio central:

3.2.1 Experimento biológico

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Genética, ESALQ-USP e foi repetido duas vezes.

Para monitorar o perfil de transcritos de cana-de-açúcar induzidos e reprimidos pela alimentação de lagartas de *D. saccharalis*, o experimento teve dois tratamentos: plantas controle e plantas atacadas por *D. saccharalis*. Lagartas de quarto ínstar foram transferidas individualmente para plantas de 20 dias, conforme descrito anteriormente. O material vegetal foi coletado no início do experimento e após 9 h. A parte aérea das plantas foi coletada, e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. Cada repetição consistiu de quatro plantas de cana. A extração de RNA foi feita como descrita anteriormente no item 3.1.1

3.2.2 Sonda *overgo*

Esta etapa foi realizada para selecionar os clones cujas replicatas apresentam quantidades similares de DNA na membrana. A sonda *overgo*, descrita por Ross et al. (1999) é produzida usando dois iniciadores que são complementares (*overgo* = *overlapping oligonucleotides*) e que formam uma região dupla-fita no interior da molécula, a região fita-simples das extremidades é preenchida com radionucleotídeos pela enzima Klenow. Nesse trabalho foi construída uma sonda

overgo específica para o gene da β -lactamase (resistência a ampicilina), presente no plasmídeo pSPORT1 usado para construir as bibliotecas do SUCEST (VETTORE et al., 2001).

O protocolo de Ross et al. (1999) foi seguido com algumas modificações (vide BARSALOBRES, 2004). Os *overgos* foram marcados com alfa³³P-dCTP por 1 h à temperatura ambiente. Depois da remoção de nucleotídeos não incorporados em colunas Sephadex G50 (Pharmacia), a sonda foi desnaturada por 3 min a 94°C em banho seco e adicionada à solução de hibridização. Todas as membranas foram colocadas em um mesmo recipiente para serem lavadas, pré-hibridizadas e hibridizadas. A pré-hibridização foi feita por 4 h a 58°C e a hibridização foi feita por 18 h na solução de hibridização: 200 mL de 1% BSA, 0,5 mM EDTA (pH 8), 7% SDS, 1 M fosfato de sódio (pH 7,2).

As membranas foram lavadas com soluções com concentração decrescente de SSC (2X, 1,5X e 0,5 X) com 0,1% SDS e expostas em *ImagingPlate* (Fuji Photo Film Co) por 72 h. Após esse período a intensidade de sinal de cada membrana foi captada pelo sistema de análise de imagens *Storm 860 Phosphorimager* (Bio-Rad) do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP sob responsabilidade do Professor Luís Lehmann Coutinho. Após o escaneamento, foi feita a retirada da sonda (*stripping*) com duas lavagens de 15 min a 65°C com uma solução 0,4 N NaOH e 0,1% SDS, seguido de mais duas lavagens de 15 min a 65°C com uma solução 0,4 N Tris-HCl (pH 8), 0,1% SDS e 1X SSC.

3.2.3 Hibridizações com populações de cDNAs de cana

Foram feitas três sondas de cDNA marcado com P³³, proveniente de RNA total de (1) plantas controle no início do experimento; (2) plantas controle, após 9h; (3) plantas atacadas por *D. saccharalis* após 9h. De cada grupo de plantas, 30 µg de RNA total foi submetido à transcriptase reversa na presença de 50 µCi de alfaP³³-dCTP, pela a enzima SuperScript III (Invitrogen), seguindo o protocolo de Schummer et al. (1999). As sondas foram purificadas em coluna G-50. Cada sonda foi sintetizada uma única vez, purificada, e dividida em três frações, mantidas em -20°C. No momento da hibridização, cada fração foi descongelada.

A pré-hibridização foi feita seguindo o protocolo Southern (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) por 2 h a 42°C, seguida da hibridização com a sonda marcada com alfa³³P-dCTP, por 20 h a 42°C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas por 15 min a 65°C com soluções com concentração decrescente de SSC (2X, 1X e 0,1 X) e 0,1% SDS. Após as lavagens, as membranas

foram expostas no *Image-Plate* por 72 horas, escaneadas e a sonda foi retirada, seguindo-se o procedimento descrito no item 3.2.2.

3.2.4 Aquisição e análise de dados

Os sinais de hibridização do fósforo radioativo nas membranas foram detectados com o *Storm 860 Phosphorimager* (Bio-Rad) à resolução de 50 μm . O arquivo com imagem foi importado pelo programa ArrayVision 8.0 rev 5.0 (Imaging Research) para transformação do valor da imagem em pixels para um valor numérico. Para cada local da membrana, o AR Volume, resíduo de fundo (*background*) e nARVOL foi medido. AR Volume é o valor de densidade de cada clone, removido de artefatos e multiplicado por sua área. Esta medida remove a influência de artefatos da imagem (por exemplo: partículas de poeira) na estimativa do volume. Os valores de *background* foram calculados baseados no valor de densidade mediana dos pixels do *background*. AR Volume normalizado (nARVOL), define o valor de volume AR de cada ponto, expresso como um múltiplo do valor de referência do ARVOL.

Os arquivos gerados pelo ArrayVision foram exportados como arquivo texto e usados pelo programa PMmA (<https://ipe.cbmeg.unicamp.br/pub/PMmA>; VICENTINI; MENOSSI, 2007). A normalização dos dados do *overgo* foi feita com o script Arrayflags, usando a mediana dos dados. O programa atribui notas para cada clone, dependendo da intensidade média e variância do sinal das quatro replicatas. Somente foram escolhidos aqueles clones onde a média de intensidade do sinal não variou entre as replicatas.

A análise dos dados foi feita baseada na variabilidade da intensidade dos dados, com o algoritmo *Intensity-dependent Selection of Expression Ratios* (ISER). O método ISER calcula a média geométrica entre as intensidades de sinal do tratamento e controle e também calcula a razão da intensidade tratamento/controle. O programa faz uma transformação dos dados para atingir a normalidade e essa transformação é aplicada às razões e à média geométrica das intensidades, resultando assim nas razões transformadas e nas intensidades transformadas. Genes são considerados induzidos se a razão transformada é maior que o limite superior da intensidade transformada. Da mesma maneira, genes são considerados reprimidos se a razão transformada é menor que o limite inferior da intensidade transformada.

Foram identificados clones induzidos e reprimidos pela alimentação da lagarta, para isso, foram comparados os dados das plantas atacadas por lagarta versus plantas controle no tempo 0h e 9h.

4 RESULTADOS

4.1 *Sugarwin*: um gene de cana-de-açúcar induzido por *D. saccharalis*

4.1.1 Comparação entre estruturas primárias de proteínas contendo o domínio barwin e as novas proteínas SUGARWIN1 e 2

O alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos do domínio barwin da SUGARWIN1 e 2 e de outras sequências de mono e dicotiledôneas revelou altos níveis de similaridade (Tabela 1 e Figura 3). SUGARWIN1 tem 73,9% de identidade e 80,7% de similaridade com SUGARWIN2, enquanto que a percentagem de similaridade de SUGARWIN2 com o domínio barwin de mono e dicotiledôneas variou de 80,7 a 93,3% (Tabela 1) e os valores de identidade chegaram a 88,2%. Da mesma forma, a identidade de SUGARWIN2 com outras proteínas que contém o domínio barwin foi de até 74,8% e a percentagem de similaridade variou de 74,8 a 81%. A sequência deduzida de aminoácidos de SUGARWIN1 e 2 encontra-se no APÊNDICE 5.

Tabela 1 – Percentagem de similaridade e identidade do domínio barwin da sequência deduzida das proteínas SUGARWIN1 e 2 em relação a proteínas de mono e dicotiledôneas com o domínio barwin

Espécie (Número no GenBank)	SUGARWIN1		SUGARWIN2		Referência
	Similaridade (%)	Identidade (%)	Similaridade (%)	Identidade (%)	
Batata (P09762)	80,7	71,4	75,6	66,4	Stanford; Bevan; Northcote (1989)
Tabaco 1 (AAB29959)	81,5	68,9	74,8	65,5	Ponstein et al. (1994)
Seringueira (AAO63572)	82,4	72,3	77,3	68,1	Pujade-Renaud et al. (2005)
Tabaco 2 (CAA41437)	80,7	70,6	78,2	69,7	Linthorst et al. (1991)
Arabidopsis (P43082)	83,2	72,3	79,8	68,9	Potter et al. (1993)
Uva (AAC33732)	83,2	75,6	80,7	74,8	Selitrennikoff (2001)
Trigo (CAA06856)	86	79,3	80,2	71,9	Caruso et al. (1999)
Cevada (P28814)	86,8	80,2	81	73,6	Svensson et al. (1992)
Milho (NP001105464)	91,6	88,2	77,3	68,9	Chevalier et al. (1995)
Arroz (AAL11444)	93,3	83,4	80,7	69,7	Agrawal et al. (2003)

Stwin2	AQNV	RATY	HTY	NP	Q	N	V	G	W	D	L	N	A	--	V	S	A	Y	C	S	T	W	D	A	N	K	F	Y	A	W	R								
NtCBP20	AQNV	RATY	HTY	NP	Q	N	V	G	W	D	L	Y	A	--	V	S	A	Y	C	S	T	W	D	A	N	K	P	L	A	W	R								
HbHEV1.2	ASN	V	L	A	T	Y	H	L	Y	N	P	Q	H	G	W	D	L	N	A	--	V	S	A	Y	C	S	T	W	D	A	N	K	F	Y	S	W	R		
NtPR4	ATN	V	R	S	T	Y	H	L	Y	N	P	Q	N	I	N	W	D	L	R	A	--	A	S	A	F	C	A	T	W	D	A	D	K	P	L	A	W	R	
AtHEL	ASN	V	R	A	T	Y	H	T	Y	N	P	A	Q	N	N	W	D	L	R	A	--	V	S	A	Y	C	S	T	W	D	A	D	K	F	Y	A	W	R	
VvPR4a	ASN	V	R	A	T	Y	H	Y	N	P	E	Q	N	G	W	D	L	N	A	--	V	S	A	Y	C	S	T	W	D	A	S	Q	P	L	A	W	R		
sugarwin2	ASG	V	R	A	T	Y	N	Y	N	P	T	Q	N	N	W	D	L	---	A	G	T	Y	C	A	T	W	D	A	G	O	P	L	S	W	R				
wheatwin2	ATN	V	R	A	T	Y	H	Y	Y	R	P	A	Q	N	N	W	D	L	G	A	P	A	V	S	A	Y	C	A	T	W	D	A	S	K	P	L	S	W	R
wheatwin1	ATN	V	R	A	T	Y	H	Y	Y	R	P	A	Q	N	N	W	D	L	G	A	P	A	V	S	A	Y	C	A	T	W	D	A	S	K	P	L	S	W	R
barwin	AND	V	R	A	T	Y	H	Y	Y	R	P	A	Q	N	N	W	D	L	G	A	P	A	V	S	A	Y	C	A	T	W	D	A	S	K	P	L	S	W	R
sugarwin1	ASN	V	R	A	T	Y	H	Y	N	P	Q	N	G	W	N	L	N	A	--	V	S	A	Y	C	A	T	W	D	A	D	K	P	L	S	W	R			
Zmdf	ASN	V	Q	A	T	Y	H	L	Y	N	P	A	Q	N	G	W	D	L	N	P	--	G	--	T	Y	C	A	T	W	D	A	D	K	P	L	S	W	R	
OsPR4	ASN	V	R	A	T	Y	H	Y	N	P	Q	N	N	W	D	L	N	K	--	V	S	A	Y	C	A	T	W	D	A	N	K	P	L	S	W	R			

Stwin2	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	V	G	P	R	G	R	D	S	C	G	K	C	L	R	V	T	N	T	R	T	G	A	Q	T	T	V	R	I	V	D	
NtCBP20	RKY	G	W	T	A	F	C	G	P	V	G	P	R	G	R	D	S	C	G	K	C	L	R	V	T	N	T	G	T	G	A	Q	T	T	V	R	I	V	D	
HbHEV1.2	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	V	G	A	H	G	Q	P	S	C	G	K	C	L	S	V	T	N	T	G	T	G	A	K	T	V	R	I	V	D		
NtPR4	QKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	P	R	G	Q	V	S	C	G	R	C	L	R	V	T	N	T	G	T	G	T	Q	T	T	V	R	I	V	D	
AtHEL	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	P	R	G	Q	A	S	C	G	K	C	L	R	V	K	N	T	R	T	N	A	A	V	T	V	R	I	V	D	
VvPR4a	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	S	G	P	T	G	Q	A	A	C	G	K	C	L	S	V	T	N	T	A	T	G	T	C	A	T	V	R	I	V	D	
sugarwin2	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	P	T	G	Q	A	A	C	G	Q	C	L	L	V	T	N	T	A	T	G	A	S	L	T	V	R	I	V	D	
wheatwin2	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	A	H	G	Q	A	A	C	G	K	C	L	R	V	T	N	P	A	T	G	A	Q	I	T	A	R	I	V	D	
wheatwin1	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	A	H	G	Q	A	S	C	G	K	C	L	Q	V	T	N	P	A	T	G	A	Q	I	T	A	R	I	V	D	
barwin	SKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	P	R	G	Q	A	A	C	G	K	C	L	R	V	T	N	P	A	T	G	A	Q	I	T	A	R	I	V	D	
sugarwin1	QKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	Q	K	G	Q	A	A	C	G	K	C	I	R	V	T	N	R	A	T	G	A	S	L	T	V	A	R	I	V	D
Zmdf	QKH	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	Q	K	G	P	C	R	C	G	K	C	I	R	V	K	N	R	A	T	G	A	S	L	T	V	A	R	I	V	D
OsPR4	QKY	G	W	T	A	F	C	G	P	A	G	P	R	G	R	D	S	C	G	K	C	I	Q	V	K	N	R	G	T	G	A	T	I	A	R	I	V	D		

Stwin2	QCS	N	G	G	L	D	L	D	I	N	--	V	F	Q	Q	I	D	T	D	G	V	G	N	Q	Q	G	H	L	I	V	N	Y	Q	F	V	N	C
NtCBP20	QCS	N	G	G	L	D	L	D	V	N	--	V	F	R	Q	L	D	T	D	G	R	G	N	Q	R	G	H	L	I	V	N	Y	E	F	V	N	C
HbHEV1.2	QCS	N	G	G	L	D	L	D	V	N	--	V	F	R	Q	L	D	T	D	G	K	G	Y	E	R	G	H	L	T	V	N	Y	Q	F	V	D	C
NtPR4	QCS	N	G	G	L	D	L	D	V	N	--	V	F	N	Q	L	D	T	N	G	V	G	Y	Q	Q	G	H	L	T	V	N	Y	E	F	V	N	C
AtHEL	QCS	N	G	G	L	D	L	D	V	A	--	M	F	N	Q	I	D	T	D	G	F	G	Y	Q	Q	G	H	L	I	V	D	Y	Q	F	V	D	C
VvPR4a	QCS	N	G	G	L	D	L	D	S	G	--	V	F	N	K	L	D	T	N	G	A	G	Y	N	Q	G	H	L	I	V	N	Y	E	F	V	D	C
sugarwin2	QCS	N	G	G	L	D	L	D	Y	D	T	A	F	K	P	L	D	T	N	G	A	G	I	Q	A	G	H	L	T	V	N	Y	Q	F	V	N	C
wheatwin2	QC	A	N	G	G	L	D	L	D	W	T	V	F	T	K	I	D	T	N	G	I	G	Y	Q	Q	G	H	L	N	V	N	Y	Q	F	V	D	C
wheatwin1	QC	A	N	G	G	L	D	L	D	W	T	V	F	T	K	I	D	T	N	G	I	G	Y	Q	Q	G	H	L	N	V	N	Y	Q	F	V	D	C
barwin	QC	A	N	G	G	L	D	L	D	W	T	V	F	T	K	I	D	T	N	G	I	G	Y	Q	Q	G	H	L	N	V	N	Y	Q	F	V	D	C
sugarwin1	QCS	N	G	G	L	D	L	D	Y	E	T	V	F	K	K	I	D	T	N	G	Q	G	Y	Q	M	G	H	L	N	V	N	Y	Q	F	V	A	C
Zmdf	QCS	N	G	G	L	D	L	D	Y	E	T	V	F	K	K	I	D	T	N	G	Q	G	Y	Q	M	G	H	L	N	V	D	Y	Q	F	V	A	C
OsPR4	QCS	N	G	G	L	D	L	D	Y	E	T	I	F	K	K	I	D	T	D	G	R	G	Y	Q	M	G	H	L	Q	V	D	Y	K	F	V	N	C

Figura 3 - Comparação de seqüências de aminoácidos do domínio barwin de SUGARWIN1 e SUGARWIN2 com plantas mono e dicotiledôneas. *Solanum tuberosum* Stwin2 (P09762), *Nicotiana tabacum* NtCBP20 (AAB29959) e NtPR4 (CAA41437), *Hevea brasiliensis* hevein HbHEV1.2 (AAO63572), *Arabidopsis thaliana* AtHEL (P43082), *Vitis vinifera* VvPR4a (AAC33732), *Triticum aestivum* wheatwin2 (CAA06857) e wheatwin1 (CAA06856), *Hordeum vulgare* barwin (P28814), *Zea mays* defense-related protein Zmdf (NP_001105464), *Oryza sativa* OsPR4 (AAL11444). O alinhamento foi feito com o programa ClustalX 4.1. Figura gerada pelo programa BOXSHADE 3.21

4.1.2 Expressão diferencial dos genes *sugarwin* em relação a herbivoria, ferimento e metil jasmonato

Os transcritos de *sugarwin1* e 2 começaram a se acumular 6 h depois da alimentação de *D. saccharalis*, e continuaram a aumentar até a última observação, 24 h depois (Figura 4). Transcritos das duas isoformas foram abundantes no local de dano pela alimentação da lagarta, no entanto, foram expressos em níveis baixos em partes da planta não danificadas. Vinte e quatro h depois do início da alimentação de *D. saccharalis*, *sugarwin1* e 2 foram 11 e 130 vezes mais expressos no local de dano do que nas plantas controle, respectivamente. Na região sistêmica, *sugarwin1* e 2 foram três e duas vezes mais expressas do que nas plantas controle, respectivamente (na Figura 4A e B, gráficos da esquerda, as linhas correspondendo à expressão na região sistêmica do controle e tratamento estão sobrepostas).

O ferimento mecânico não resultou em acumulação de transcritos na região local ou sistêmica para *sugarwin1* (Figura 4A, painel da direita), no entanto, *sugarwin2* foi 37 vezes mais expressa do que em plantas controle no local do ferimento, depois de 12 horas. Sistemicamente, a expressão de *sugarwin2* foi a mesma daquela observada em plantas controle (Figura 4B, gráficos da direita, as linhas da região local e sistêmica das plantas controle e ferimento sistêmico estão sobrepostas).

A expressão do inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk (*IPBB*) de cana, usada como controle positivo para os tratamentos de herbivoria e ferimento foi altamente induzida pelo ataque de *D. saccharalis*. No local de alimentação do inseto, os transcritos de *IPBB* foram 110 e 320 vezes mais abundantes do que nas plantas controle, seis e 24 h depois do dano, respectivamente (Figura 4C, painel da esquerda, as linhas para as plantas controle local e sistêmico estão sobrepostas). Vinte e quatro h depois da alimentação da lagarta, na região não danificada (sistêmica), os transcritos de *IPBB* foram 392 vezes mais abundantes do que em plantas controle. Além disso, o ferimento mecânico resultou em níveis mais altos de transcritos no local de ferimento do que em partes sistêmicas (Figura 4C, gráfico da direita). No local do ferimento, o nível de RNA mensageiro teve seu pico 12 h depois do início do ferimento mecânico, quando os transcritos de *IPBB* foram 17 vezes maiores do que nas plantas controle.

Figura 4 - Análise de PCR em tempo real da abundância de transcritos de (A) *sugarwin1*; (B) *sugarwin2* e (C) inibidor de proteinase, em resposta a herbivoria por *D. saccharalis* (gráficos da esquerda) e ferimento mecânico (gráficos da direita). Os valores são a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene *GAPDH*. O valor de 1 foi atribuído ao tempo inicial (0 h). O tecido foliar foi separado em região local, onde o ferimento foi feito (linhas vermelhas com símbolos vazios) e região sistêmica, as partes da folha onde não houve ferimento (linhas pretas com símbolos preenchidos). Quadrados: plantas onde a broca-da-cana se alimentou. Círculos: plantas onde foi feito o ferimento mecânico. Losangos: plantas controle

Com o intuito de investigar a expressão dos genes de *sugarwin* em resposta à patógenos, foi produzido um fermento mecânico uma única vez e uma suspensão de esporos de *F. verticillioides* e *C. falcatum* foi inoculada. Em todos os genes estudados, a inoculação com a suspensão de esporos induziu a acumulação de transcritos em níveis comparáveis àqueles ao controle, onde foi inoculada água (Figura 5). A indução do gene *IPBB* observada em plantas inoculadas com suspensão de esporos e água, seis vezes superior ao controle, provavelmente foi o resultado do fermento feito nas plantas (Figura 5C). Na avaliação do efeito sistêmico, não foi observada indução dos genes *sugarwin1* e *2* e *IPBB* tanto nas plantas inoculadas com água quanto naquelas inoculadas com suspensão de esporos dos fungos (Figura 5, símbolos fechados).

Nos tratamentos onde foram pulverizados metil jasmonato (MJ) e metil salicilato (MS), somente o tratamento com MJ induziu a transcrição dos genes que codificam as SUGARWINS e *IPBB*. O MJ aumentou a expressão de *sugarwin1* e *2* em menor grau do que *IPBB* (Figura 6, gráficos da esquerda). O MS não mostrou nenhum efeito de indução nos genes que codificam as SUGARWINS ou em *IPBB* (Figura 6, gráficos da direita).

4.1.3 Localização subcelular de SUGARWINS

A região N-terminal de SUGARWIN1 e 2 é altamente hidrofóbica e mostra características similares à peptídeos sinal para translocação para o retículo endoplasmático. Segundo o programa TargetP v1.1 (EMANUELSSON et al., 2000, 2007) existe a probabilidade de 98% de proteínas com essa sequência de direcionamento serem secretadas. Quando expressas de forma transiente em células de epiderme de cebola, as proteínas SUGARWINS fusionadas à *gfp* (SUGARWIN1::*GFP* e SUGARWIN2::*GFP*) foram detectadas no retículo endoplasmático e no apoplasto (Figura 7A e C). Isso indica que as proteínas quiméricas foram exportadas para o exterior da célula. A construção mgfp5-ER (HASELOFF et al., 1997) mostrou retenção do sinal de *gfp* exclusivamente no retículo endoplasmático (Figura 7E). A clonagem das *sugarwins* em fase de leitura com a *gfp* foram confirmadas por sequenciamento de DNA

Figura 5 - Análise de PCR em tempo real da abundância de transcritos de (A) *sugarwin1*, (B) *sugarwin2* e (C) inibidor de proteinase, em resposta ao ferimento mecânico seguido da inoculação de esporos de fungo (gráficos da esquerda) e inoculação de água (gráficos da direita). Os valores correspondem a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene *GAPDH*. O valor de 1 foi atribuído ao tempo inicial (0 h). O tecido foliar foi separado em região local, onde o ferimento foi feito (linhas vermelhas com símbolos vazios) e região sistêmica, as partes da folha onde não houve ferimento (linhas pretas com símbolos preenchidos). Triângulos: plantas inoculadas com esporos. Círculos: plantas inoculadas com água. Losangos: plantas controle

Figura 6 - Análise de PCR em tempo real da abundância de transcritos de (A) *sugarwin1*; (B) *sugarwin2* e (C) inibidor de proteinase, em resposta à pulverização de metil jasmonato (gráficos da esquerda) e metil salicilato (gráficos da direita). Os valores correspondem a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene *GAPDH*. O valor de 1 foi atribuído ao tempo inicial (0 h). Linhas vermelhas com quadrados preenchidos: plantas tratadas com metil jasmonato. Linhas pretas com quadrados vazios: plantas controle. Linhas azuis com círculos preenchidos: plantas tratadas com metil salicilato. Linhas pretas com círculos vazios: plantas controle

Figura 7 - Imagens da localização subcelular de proteínas expressas em células de epiderme de cebola obtidas por microscópio confocal. (A e B) SUGARWIN1, (C e D) SUGARWIN2 e (E e F) mgfp5-ER (controle de transporte para o retículo endoplasmático). A microscopia de fluorescência e de contraste diferencial de interferência foi feita usando o equipamento Zeiss Axiovert® 100M (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)

4.1.4 Produção de SUGARWIN1 recombinante

SUGARWIN1 fusionada à cauda de histidinas foi expressa em *E. coli* e purificada através de resina de níquel (Figura 8).

Figura 8 - SDS-PAGE da purificação de SUGARWIN1 recombinante em coluna de afinidade sob condições desnaturantes. Gel de 1,5mm de espessura, 15% de acrilamida e corado com Coomassie blue. A indução da proteína foi feita com 1mM de IPTG por 4 h a 37°C. Canaleta 1: marcador de peso molecular, indicando 0,5 µg de proteína; Canaleta 2: amostra antes da indução com IPTG; Canaleta 3: quatro horas depois da indução com IPTG; Canaleta 4: sobrenadante depois da lise (fração solúvel); Canaleta 5: precipitado depois da lise (fração insolúvel); Canaleta 6: amostra da fração insolúvel aplicada na coluna; Canaleta 7: amostra que passou pela coluna (*flow-through*); Canaleta 8: lavagem da coluna; Canaleta 9: eluído; Canaleta 10: marcador de peso molecular, indicando 1 µg de proteína

Conforme esperado, a expressão da proteína recombinante mostrou-se dependente da adição de IPTG, pois somente em células induzidas por IPTG foi detectada a SUGARWIN (Figura 8, canaletas 1 e 2). Depois da lise com lisozima, observou-se que a quase totalidade da proteína encontra-se na fração insolúvel (Figura 8, canaletas 3 e 4). A ligação da cauda de histidina da proteína recombinante com o níquel imobilizado na resina de afinidade mostrou-se muito forte. A proteína encontra-se na fração aplicada na coluna e não foi detectada na fração que não se liga na resina (*flow-through*), tampouco nas lavagens (Figura 8, canaletas 5, 6, 7 e 8). O SDS-PAGE mostra que a proteína purificada com a cauda de histidinas tem uma massa molecular (Mr) de aproximadamente 16000, o que é condizente com a massa molecular esperada da SUGARWIN1 acrescida da cauda de histidinas (15,7 kDa) (Figura 8, canaleta 9).

Depois da diálise e liofilização, obteve-se uma produção de 23,3 mg de SUGARWIN1 recombinante por litro de cultura de bactéria.

4.1.5 Efeito de SUGARWIN1 em parâmetros biológicos de *D. saccharalis*

Após a incorporação da proteína na dieta, o desenvolvimento de neonatas de *D. saccharalis* foi acompanhado até a fase de pupa. SUGARWIN1 não afetou a duração do período larval nas duas concentrações usadas ($F = 0,10$; $df = 2, 61$; $P = 0,908$) (Tabela 2), a duração média do período larval foi de 25,6 dias. O peso de pupas também não foi afetado ($F = 0,34$; $df = 2, 62$; $P = 0,713$). Em todos os tratamentos as pupas tiveram um peso médio de 0,16 mg.

Tabela 2 – Efeito da proteína SUGARWIN1 recombinante adicionada à dieta artificial no peso de pupas e duração do período larval de lagartas de *Diatraea saccharalis*

Tratamento	Peso de pupa (mg) ^a	Duração do período larval (dias) ^a
Dieta controle	0,17 ± 0,01 (22)	25,33 ± 0,60 (21)
10 ppm	0,16 ± 0,01 (22)	25,73 ± 0,63 (22)
20 ppm	0,17 ± 0,01 (21)	25,62 ± 0,73 (21)

^a número de insetos é mostrado entre parênteses

4.1.6 Efeito de SUGARWIN1 no crescimento micelial de fungos

A proteína adicionada a discos de papel filtro não afetou o crescimento micelial de *F. verticillioides* (Figura 9A) ou de *C. falcatum* (Figura 9B). De acordo com avaliação do crescimento dos fungos, não foram detectados halos de inibição do crescimento, ao redor dos discos de papel filtro.

Figura 9 – Teste de inibição de crescimento de *Fusarium verticillioides* (A) e *Colletotrichum falcatum* (B) em meio batata dextrose ágar (BDA) a 25°C. Discos de papel filtro (1 cm de diâmetro) foram colocados nos bordos de crescimento e 20 µg da proteína SUGARWIN1 em tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) ou somente o tampão PBS foi adicionado aos discos de papel, como controle

4.1.7 Produção de SUGARWIN2 recombinante

Após a indução por IPTG, no vetor pET32a sem modificação (vetor vazio usado como controle), foi detectada a produção da tioredoxina e a porção de proteína da parte C-terminal do vetor, resultando em uma proteína de 201 aminoácidos com uma massa molecular esperada de 21,7 kDa, de acordo com a análise por SDS-PAGE (Figura 10).

A análise por SDS-PAGE mostrou a proteína de SUGARWIN2 com uma massa molecular (Mr) de aproximadamente 31000, que está de acordo com a massa esperada de SUGARWIN2

somada à cauda de histidina e a tioredoxina (Figura 11). A fração solúvel da proteína foi purificada com sucesso, resultando na produção de aproximadamente 4 mg de proteína por litro de cultura.

Figura 10 - SDS-PAGE da purificação do controle, vetor pET32a vazio em coluna de afinidade sob condições não-desnaturantes. Gel de 0,75mm de espessura, 15% de acrilamida e corado com Coomassie blue. A indução da proteína tioredoxina foi feita com 1mM de IPTG por 4 h a 37°C. Exceto nas canaletas 7, 8 e 9 foram aplicados 5 μ L de cada amostra no gel. Canaleta 1: marcador de peso molecular indicando 1 μ g de proteína; Canaleta 2: amostra da fração solúvel aplicada na coluna; Canaleta 3: amostra que passou pela coluna (*flow-through*); Canaleta 4: lavagem da coluna; canaleta 5: eluído com 500 mM de imidazole (parte final da eluição); Canaleta 6: eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição); Canaleta 7: 2,5 μ L do eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição); Canaleta 8: 1,25 μ L do eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição); Canaleta 9: 0,625 μ L do eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição); canaleta 10: eluído com 250 mM de imidazole

Figura 11 - SDS-PAGE da purificação de SUGARWIN2 em coluna de afinidade sob condições não-desnaturantes. Gel de 0,75mm de espessura, 15% de acrilamida e corado com Coomassie blue. A indução da proteína foi feita com 1mM de IPTG por 4 h a 37°C. Exceto nas canaletas 8, 9 e 10 foram aplicados 5 μ L de cada amostra no gel. Canaleta 1: marcador de peso molecular indicando 1 μ g de proteína; Canaleta 2: amostra da fração solúvel aplicada na coluna; Canaleta 3: amostra que passou pela coluna (*flow-through*); Canaleta 4: lavagem da coluna; Canaleta 5: eluído com 250 mM de imidazole; Canaleta 6: eluído com 500 mM de imidazole (parte final da eluição); Canaleta 7: eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição); Canaleta 8: 2,5 μ L do eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição); Canaleta 9: 1,25 μ L do eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição); Canaleta 10: 0,625 μ L do eluído com 500 mM de imidazole (parte frontal da eluição)

A proteína SUGARWIN2 recombinante foi digerida para que seu primeiro aminoácido glutamina fosse exposto. A digestão também foi feita com o vetor vazio, para ser usado como controle. A eficiência da digestão foi monitorada por SDS-PAGE (Figura 12).

Figura 12 - SDS-PAGE da digestão de SUGARWIN2 com a Endoproteinase Glu-C (Roche). Gel de 0,75mm de espessura, 15% de acrilamina e corado com Coomassie blue. Canaleta 1: marcador de peso molecular indicando 1 μ g de proteína; Canaleta 2: SUGARWIN2 antes da digestão; Canaleta 3: SUGARWIN2 depois de 8 h de digestão a 25°C; Canaleta 4: SUGARWIN2 depois da digestão e liofilização; Canaleta 5: marcador de peso molecular indicando 0,5 μ g de proteína; Canaleta 6: controle, vetor vazio antes da digestão; Canaleta 7: controle, vetor vazio depois de 8 h de digestão a 25°C; Canaleta 8: controle, vetor vazio depois da digestão e liofilização

4.1.8 Efeito de SUGARWIN2 na germinação de esporos de fungos

A análise do crescimento de *F. verticillioides* na presença de SUGARWIN2 e do vetor vazio no meio de cultura revelou que houve uma ligeira queda no crescimento 24 e 36 h depois. Em relação à percentagem do crescimento dos fungos na presença de água, a percentagem de crescimento do fungo na presença de SUGARWIN representou 95,7 e 95,4% nos tempos 24 e 36 h. O crescimento na presença do vetor vazio representou 91,4 e 90% nos tempos 24 e 36h, em relação ao crescimento na presença de água. Após 48 h, a percentagem de crescimento tanto na presença de SUGARWIN, quanto do vetor vazio, foi superior ao crescimento na presença de água (Figura 13A). Para *C. falcatum* a presença de SUGARWIN2 afetou ligeiramente o crescimento nas avaliações de 24 e 36 h (representando 94,5 e 94% do crescimento do fungo na presença de água, respectivamente). Na presença do vetor vazio, a percentagem de crescimento nas avaliações

de 24 e 36 h foi de 97,2 e 98% do crescimento na presença de água. (Figura 13B). Após 48 h, o crescimento de *C. falcatum* na presença de SUGARWIN2 ou vetor vazio superou o crescimento em água.

Figura 13 – Curva de germinação de esporos e crescimento micelial de (A) *Fusarium verticillioides* e (B) *Colletotrichum falcatum* na presença de 200 µg/mL de SUGARWIN2 (linha vermelha com símbolos fechados); do vetor vazio (linha preta com símbolos abertos) e de água (linha no valor de 100%). A comparação da percentagem de germinação de esporos na presença de SUGARWIN2 e do vetor vazio foi feita tomando-se como valor máximo (100%) o valor de absorbância dos fungos na presença do controle (água)

4.2 Análise dos macroarranjos contendo seqüências de cana-de-açúcar de serino proteases e inibidores de proteases

4.2.1 Construção de macroarranjos de seqüências de cana-de-açúcar e análise dos dados

A nomenclatura usada para esse estudo foi aquela estabelecida para metodologias de hibridização de microarranjos, onde o alvo é o DNA imobilizado na superfície da membrana, e a sonda é o cDNA marcado que é hibridizado com o DNA que está imobilizado na membrana (ROSE, 2000; NOGUEIRA et al., 2003).

Foram feitas duas repetições do experimento no tempo. Para cada repetição foram usadas três membranas de nitrocelulose. Três sondas de cDNA marcadas com radioativo foram construídas usando-se o RNA total extraído das plantas do experimento como molde : (1) plantas controle no tempo 0h; (2) plantas controle no tempo 9h; e (3) plantas atacadas por *D. saccharalis* no tempo 9h. Cada sonda foi hibridizada sucessivamente com uma membrana diferente, para eliminar a variação membrana-membrana. Assim, foram feitas três rodadas de hibridizações.

A população de cDNA marcada radioativamente (sonda) foi dividida de forma a ser utilizada em mais de uma hibridização. Clones que mostraram expressão distinta em diferentes hibridizações mas que eram provenientes da mesma sonda não foram considerados na análise . Somente foram considerados aqueles clones que apresentaram o mesmo padrão de expressão nas duas repetições no tempo do experimento.

Antes da hibridização com as sondas de cDNA do experimento, as membranas foram hibridizadas com uma sonda correspondente ao vetor plasmidial, chamada de *overgo* (Figura 14). O valor mediano para todas as intensidades de sinal dos *spots* foi determinado e o coeficiente de variação desses valores medianos foi estimado para acessar a flutuação na quantidade de DNA entre as replicatas (VICENTINI; MENOSSE, 2007). Somente as réplicas com valores de coeficiente de variação menores que 10% foram usadas para análises posteriores.

Figura 14 – Intensidade do sinal de hibridização com a sonda *overgo*. O sinal observado é específico para o gene da β -lactamase (resistência a ampicilina), presente no plasmídeo pSPORT1 e usado para construir as bibliotecas do SUCEST (VETTORE et al., 2001). As membranas contendo 248 clones de cana-de-açúcar em quadruplicata foram hibridizadas com a sonda *overgo* marcada com P^{33} . Os sinais de hibridização foram detectados com *Storm 860 Phosphorimager* (Bio-Rad) à resolução de 50 μ m

4.2.2 Identificação de genes induzidos pelo ataque de *D. saccharalis*

Na Figura 15 é mostrado um exemplo da detecção do sinal de hibridização da sonda de cDNA marcado com P^{33} com o DNA imobilizado nas membranas. Dois clones foram selecionados para facilitar a visualização. SCCCS2001B07.g, ressaltado pelo quadrado, tem um sinal de hibridização mais forte na sonda das plantas atacadas por *D. saccharalis* (C), do que em plantas controle no tempo 0h (A) e 9h (B). Esse é o homólogo de cana-de-açúcar ao inibidor de proteinase de milho (TIFFIN; HACKER; GAUT, 2004). O clone marcado por um círculo também

mostrou sinal mais forte na sonda das plantas atacadas pela lagarta. Esse clone é o homólogo de cana-de-açúcar ao inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk de arroz.

Figura 15 – Exemplos de membranas de macroarranjos usadas para analisar a expressão de genes em resposta à alimentação de *D. saccharalis*. As membranas foram hibridizada com a sonda de cDNA marcada com P^{33} proveniente de RNA total das plantas controle no tempo 0h. (A); plantas controle no tempo 9h (B); plantas atacadas por *D. saccharalis* no tempo 9h (C). As réplicas ressaltadas indicam exemplos de clones de cana-de-açúcar induzidos pela alimentação de *D. saccharalis*. Os sinais de hibridização foram detectados com *Storm 860 Phosphorimager* (Bio-Rad) à resolução de 50 μm

A seleção dos genes diferencialmente expressos foi feita baseada na análise da variabilidade da razão tratamento/controle. A análise leva em consideração a intensidade do sinal de hibridização e foi feita pelo programa PMmA (VICENTINI; MENOSSI, 2007). Genes são considerados induzidos se a razão transformada é maior que o limite superior da intensidade transformada. Da mesma maneira, genes são considerados reprimidos se a razão transformada é menor que o limite inferior da intensidade transformada. A Figura 16 mostra o gráfico gerado pela análise da variabilidade da razão de expressão dependente da intensidade do sinal proveniente da

sonda de plantas atacadas por *D. saccharalis* após 9 h ,versus o sinal da sonda de plantas controle após 9 h. Os dados usados para essa análise são provenientes da primeira repetição do experimento. Os genes acima da linha vermelha são considerados induzidos, enquanto que os genes abaixo da linha verde são considerados reprimidos.

Figura 16 – Gráfico gerado pela análise da variabilidade da razão de expressão dependente da intensidade (*Intensity-dependent Selection of Expression Ratios, ISER*). A razão entre o sinal da sonda das plantas atacadas pela lagarta versus o sinal da sonda das plantas controle, no tempo 9h foi usado

Do total de genes presentes no arranjo, 24 (9,6%) foram responsivos a herbivoria. Somente foram levados em consideração os genes diferencialmente expressos nas duas repetições do experimento.

Quatorze genes foram induzidos (5,6% do total de genes presentes no macroarranjo) por herbivoria (Tabela 3), dos quais quatro são homólogos de cana-de-açúcar a inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk de milho e arroz (SCEZLB1014H01.g, SCAGLB2046F01.g, SCQGRT3045E08.g, SCCCS2002C05.g). Esses genes tiveram a razão de expressão entre o tratamento (sonda de plantas de cana atacadas por *D. saccharalis*) e o controle (sonda de plantas controle, no tempo 9h) bem alta, atingindo o valor de 31 para a sequência SCCCS2002C05.g (Tabela 3, última coluna).

Dois genes de cana (SCCCCL7C03A06.g e SCCCS2001B07.g) são homólogos ao inibidor de proteinase de milho, com 89 e 84% de identidade, respectivamente. Esses genes tiveram o mesmo padrão de indução em todas as membranas que se fez a rotação da mesma sonda de cDNA, nas duas repetições do experimento, além disso, a razão do sinal tratamento/controle foi de 10,3 para SCCCL7C03A06.g e 12,7 para SCCCS2001B07.g, respectivamente.

Uma sequência de cana-de-açúcar homóloga ao inibidor de subtilisina (93% de identidade), SCRFLR2037D05.g, teve a razão de intensidade de sinal de plantas atacadas/não atacadas de 5,3.

Entre as proteases induzidas por herbivoria, dois homólogos à serino proteases da família S10 de arroz, SCCCAD1002F08.g e SCEQRT2026F11.g, com 69 e 75% de identidade, tiveram razão de sinal em plantas atacadas/não atacadas de 11 e 5,7. O homólogo da S8 de arroz, com 73% de identidade, SCRUF3064H08.g, teve o sinal de hibridização 3,5 vezes mais intenso em plantas atacadas. SCQGRT1041D10.g é o homólogo da protease Clp da família S14 de arroz (93% de identidade) e o sinal de hibridização foi 4 vezes mais intenso em plantas atacadas. SCBFRZ3006A04.g, o homólogo da oligopeptidase da família S9 de arroz (85% de identidade) teve o sinal de hibridização 11 vezes mais forte em plantas atacadas por *D. saccharalis* do que em plantas não atacadas.

Duas sequências de cana-de-açúcar não tiveram sequências similares depositadas no banco de dados (SCCCLR1024A12.g e SCCCS2091G11.g).

Apesar dos inibidores do tipo Bowman-Birk constituírem somente 6,8% do total dos clones presente no arranjo, eles representaram a maioria dos genes induzidos pela alimentação de

D. saccharalis. O inibidor de proteinase de milho, e o inibidor de subtilisinas fazem parte da família de inibidores de batata, que constitui 3,6% dos clones do arranjo.

4.2.3 Identificação de genes reprimidos pelo ataque de *D. saccharalis*

Foram identificados oito genes de cana-de-açúcar reprimidos pela alimentação da lagarta (Tabela 4), representando 3,23% do total de genes presente no arranjo.

Duas seqüências são homólogas a membros da família S8 de arroz, com 80 e 54% de identidade (SCQSLB1049F06.g e SCRFLB1056C08.g), a razão entre a intensidade do sinal entre plantas atacadas por *D. saccharalis* e plantas não atacadas foi de 0,27 e 0,28 respectivamente.

Homólogos das serino carboxipeptidase S10 de arroz, com 90 e 74% de identidade (SCQSSB1059G07.g e SCCRZ3003A05.g) tiveram a razão tratamento/controle de 0,20 e 0,14.

Homólogos a proteases de arroz das famílias S1 (SCRUFL4022D11.g) com razão de 0,14, família S14 (SCQSAM2047G01.g) com razão de 0,26, família S54 (SCCCLR1065D12.g) com razão de 0,13 e uma protease homóloga a família S41 (SCCCFL5096F09.g) de cevada apresentou a razão de sinal tratamento/controle de 0,1.

Tabela 3 – Lista de genes induzidos pela alimentação de *D. saccharalis*

(continua)

Identificação	Número do acesso GenBank	do no	Espécie	Descrição ^a	E-value	% identida de	Referência	Razão ^c
SCCCAD1002F08.g	AP008217.1 BAF28224.1		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	Serine carboxypeptidase S10	6e-56	104/150 (69%)	Não publicado	11,3
SCRUFL3064H08.g	AAP53584.1 GI:31431872		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	Subtilisin N-terminal Region, S8	1e-70	126/172 (73%)	RC10SC (2003) ^b	3,5
SCEZLB1014H01.g	BAA99379.1 GI:9049424		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	2e-06	25/60 (41%)	Sasaki et al. (2002)	12,0
SCAGLB2046F01.g	AAC24570.1 GI:3264598		<i>Zea mays</i>	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	4e-72	118/145 (81%)	Não publicado	29,2
SCCCCL7C03A06.g	ABA34116.1 GI:75994161		<i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	maize protease inhibitor	3e-27	59/66 (89%)	Moeller e Tiffin (2005)	10,32
SCCCLR1024A12.g				Sem similaridade				6,9
SCQGRT3045E08.g	BAB64603.1 GI:15528581		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	1e-33	85/98 (86%)	Sasaki et al. (2002)	26,2
SCRFLR2037D05.g	ABA98883.1 GI:77556087		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor (CI-1B)	0.36	16/23 (69%)	RC11 12SC (2005) ^b	5,3
SCQGRT1041D10.g	AAN78327.1 GI:26518520		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	ATP-dependent Clp protease, S14	7e-72	88/94 (93%)	Shen et al. (2003)	3,93
SCEQRT2026F11.g	ABG65882.1 GI:110288513		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	Serine carboxypeptidase S10	2e-57	107/142 (75%)	RC10SC (2003) ^b	5,73
SCCCSD2002C05.g	BAA99380.1 GI:9049425		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	3e-45	85/98 (86%)	Sasaki et al. (2002)	31,0

Tabela 3 – Lista de genes induzidos pela alimentação de *D. saccharalis*

(conclusão)								
Identificação	Número do acesso GenBank	do no	Espécie	Descrição ^a	E-value	% identida de	Referência	Razão ^c
SCBFRZ3006A04.g	BAD62124.1 GI:54291358		<i>Oryza sativa</i> (japônica)	putative oligopeptidase B, S9	8e-66	119/139 (85%)	Não publicado	10,9
SCCCSD2001B07.g	AAT40067.1 GI:48093378		<i>Zea diploperen nis</i>	maize protease inhibitor, Potato inhibitor I family	4e-25	59/70 (84%)	Tiffin; Hacker e Gaut (2004)	12,7
SCCCSD2091G11.g				Sem similaridade				13,3

^a provável identidade do cDNA baseado em procura por similaridade com seqüências conhecidas de proteínas no GenBank usando o algoritmo BLASTX.

^b RC10SC (2003) The Rice Chromosome 10 Sequencing Consortia (2003); RC11 12 SC (2005), Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia (2005)

^c razão entre o valor da intensidade de sinal transformada da sonda de plantas atacadas por *D. saccharalis* e a da sonda de plantas controle, no tempo 9h.

Tabela 4 – Lista de genes reprimidos pela alimentação de *D. saccharalis*

Identificação	Número do acesso no GenBank	Espécie	Descrição ^a	E-value	% identidade	Referência	Razão ^b
SCRUFL4022D11.g	AAX96667.1 GI:62734558	<i>Oryza sativa</i> (japônica)	trypsin-like, S1	5e-51	101/114 (88%)	Não publicado	0,14
SCQSLB1049F06.g	BAD08783.1 GI:42407651	<i>Oryza sativa</i> (japônica)	putative subtilisin-like proteinase, S8	2e-37	80/100 (80%)	Não publicado	0,27
SCRFLB1056C08.g	BAB21149.1 GI:12328490	<i>Oryza sativa</i> (japônica)	subtilisin-like, S8	3e-62	145/264 (54%)	Sasaki et al. (2002)	0,28
SCQSAM2047G01.g	BAD68462.1 GI:55296987	<i>Oryza sativa</i> (japônica)	putative ATP-dependent Clp protease, S14	3e-104	187/202 (92%)	Não publicado	0,26
SCCCFL5096F09.g	CAA62434.1 GI:1296805	<i>Hordeum vulgare</i>	CtpA, C-terminal processing protease, S41	6e-17	45/80 (56%)	Oelmuller; Herrmann e Pakrasi (1996)	0,1
SCCCLR1065D12.g	BAD38035.1 GI:51535953	<i>Oryza sativa</i> (japônica)	rhomboid-like protein, S54	7e-75	134/156 (85%)	Não publicado	0,13
SCQSSB1059G07.g	BAD25095.1 GI:49387539	<i>Oryza sativa</i> (japônica)	putative carboxypeptidase D, S10	4e-13	36/40 (90%)	Não publicado	0,20
SCCCRZ3003A05.g	BAD07656.1 GI:41052788	<i>Oryza sativa</i> (japônica)	putative serine carboxipeptidase, S10	4e-46	90/121 (74%)	Não publicado	0,14

^a provável identidade do cDNA baseado em procura por similaridade com seqüências conhecidas de proteínas no GenBank usando o algoritmo BLASTX.

^b razão entre o valor da intensidade de sinal transformada da sonda de plantas atacadas por *D. saccharalis* e a da sonda de plantas controle, no tempo 9h.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização de *sugarwin*: um gene de cana-de-açúcar induzido por *D. saccharalis*

Os resultados da indução de genes de cana-de-açúcar pela alimentação de lagartas de *D. saccharalis*, evidenciaram a presença de genes envolvidos com defesa de cana-de-açúcar. As defesas induzidas envolvem uma grande quantidade de proteínas e outras moléculas cuja síntese é controlada espacial e temporalmente (KARBAN; BALDWIN, 1997; WALLING, 2000).

Duas proteínas de cana-de-açúcar, chamadas aqui de SUGARWIN1 e SUGARWIN2, mostraram elevados níveis de similaridade com os domínios barwin de mono e dicotiledôneas (Tabela 1 e Figura 3). A associação do domínio barwin com o domínio heveína tem um padrão de evolução intrincado. As plantas dicotiledôneas formam dois grupos filogenéticos: aqueles que tem o domínio heveína associado ao barwin e aqueles que somente possuem o domínio barwin (AGRAWAL et al., 2003; BRAVO et al., 2003; ZHU; SONG; ZHENG, 2006). As plantas monocotiledôneas, inclusive cana-de-açúcar, somente possuem o domínio barwin não associado ao domínio heveína.

Os genes *sugarwin* mostraram um padrão de expressão típico de “genes de expressão tardia”. Em tomate, assim são chamados os genes cujos transcritos aumentam 4 a 12 h depois do ferimento, em contraste com os chamados “genes de expressão rápida”, cujos transcritos aparecem dentro de 30 min depois do ferimento (RYAN, 2000). Estudos de expressão gênica mostram um padrão de expressão tardio para outras proteínas do tipo barwin: em *Wasabia japonica* mRNAs de WjAMP foram aumentados significativamente 24 e 48 h após inoculação com *Botrytis cinerea* ou *Alternaria alternata* (KIBA et al., 2003). Em milho, o ferimento e inoculação com *F. verticillioides* induziram a expressão de ZmPR4 depois de 24 h (BRAVO et al., 2003).

O ferimento mecânico, feito com o auxílio de uma pinça fina, e repetido de hora em hora, provocou uma indução transitória dos genes *sugarwin*. A expressão de transcritos de *sugarwin* aumentou progressivamente após o primeiro dano, atingiu seu valor máximo às 12 h e depois diminuiu (Figura 4A e B, gráficos da direita). Esse comportamento transiente não foi observado quando as plantas foram submetidas ao ataque de *D. saccharalis*. Isso ocorreu, provavelmente, pelo fato do dano mecânico provocado pela lagarta ser constante e progressivo. Em plantas atacadas pela lagarta, pode-se notar que houve um aumento na expressão depois de 12 h (Figura 4A e B, gráficos da esquerda).

Transcritos de *sugarwin1* e 2 foram induzidos a altos níveis no local de dano mecânico ou dano provocado pelo inseto, enquanto que foram expressos em níveis muito baixos no tecido sistêmico (Figura 4A e B). Comparativamente, a herbivoria induziu a acumulação sistêmica de transcritos de *IPBB* em maiores níveis nos tecidos sistêmicos (Figura 4C). Os inibidores de proteinase são uma classe de proteínas de defesa induzidas por dano (*win*) em que a função da defesa de plantas contra herbívoros está bem estabelecida e onde os mecanismos fisiológicos por trás dessa função estão bem estudados (BERGEY; HOWE; RYAN, 1996; KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997; RYAN, 2000). Tem sido mostrado que o ferimento nas folhas de um grande número de famílias de plantas resulta na síntese de proteínas de defesa tanto no local de dano como em folhas sistêmicas distais (GREEN; RYAN, 1972; MOURA; RYAN, 2001). Esse alto nível de expressão observado em folhas sistêmicas reforça as propriedades anti-nutritivas de *IPBB* e podem resultar em proteção aumentada contra insetos mastigadores, visto que esse tipo de inseto destrói tecidos foliares rapidamente.

A acumulação de transcritos de *sugarwins* exclusivamente no local de dano pode estar relacionada com sua função na defesa da planta. *ZmPR4* é uma proteína do tipo *barwin* de milho, e, através de experimentos de hibridização de RNA *in situ*, foi mostrada sua acumulação nos mesmos tecidos infectados por fungo em embriões germinados (BRAVO et al., 2003). Os autores sugerem que a expressão do gene *ZmPR4* pode ser parte da resposta de defesa contra fungos em sementes de milho em germinação. Essa observação também pode ser estendida para os genes *sugarwin*. A queda de produtividade de cana-de-açúcar devido ao complexo podridão vermelha, causada pelos fungos *C. falcatum* e *F. verticillioides*, é um prejuízo indireto causado pelo ataque da broca-da-cana. Esses fungos oportunistas passivamente penetram no colmo da cana através das galerias abertas pela broca. Assim, se a proteína *SUGARWIN* tiver função anti-patogênica, níveis aumentados de transcritos de *sugarwin* no local do dano podem ser traduzidos em proteína para diminuir a possibilidade de colonização da planta por fungos oportunistas.

A aplicação de suspensão de esporos de *C. falcatum* e *F. verticillioides* no ferimento mecânico resultou em níveis de acumulação de transcritos de *sugarwin* similares àqueles obtidos quando se aplicou somente água no ferimento (Figura 5A e B). Isso sugere que o ferimento é único responsável pela indução dos genes *sugarwin*. Normalmente, esses fungos não penetram ativamente no tecido de cana-de-açúcar e usam as galerias abertas pela lagarta como porta de entrada para colonizar a planta de cana. Assim, se a atividade antifúngica de proteínas da família

Barwin estiver conservada para *sugarwins*, os resultados sugerem que, seguindo o curso da evolução, a planta poderia usar a alimentação pelo inseto como um sinal para ativar as defesas contra os fungos que irão invadir o colmo pela abertura provocada pelo inseto.

Em cana-de-açúcar, a transcrição de *sugarwin* foi induzida por tratamento com metil jasmonato (Figura 6, gráficos da esquerda), que é condizente com o padrão de um gene induzido por inseto e por ferimento. Geralmente, a sinalização da via do ácido jasmônico é fundamental para ativar proteção contra ataque de herbívoros (HOWE, 2005) e aparenta mobilizar defesas antimicrobianas efetivas contra patógenos necrotróficos, enquanto que a defesa mediada por ácido salicílico é efetiva contra fungos biotróficos, bactérias e viroses (GLAZEBOOK, 2005). Os genes do tipo barwin têm sido descritos como induzidos pela aplicação de fitohormônios. Por exemplo, em milho, Bravo et al. (2003) mostraram a acumulação de mRNA de ZmPR4 seguido da aplicação de MJ. Em tabaco, PR4 é induzida quatro dias depois da aplicação de ácido salicílico (LINTHORST et al., 1991). Em arroz, OsPR4 é induzida por MJ e ácido abscísico (AGRAWAL et al., 2003). Bertini et al. (2003) mostram que o gene wPR4ef de trigo é induzido pela aplicação de AJ e AS.

Análises da estrutura primária das proteínas deduzidas dos dois homólogos de barwin em cana-de-açúcar indicam que as proteínas são sintetizadas como pré-proteínas, com um peptídeo N-terminal envolvido em secreção extracelular. Peptídeos sinal de SUGARWIN fusionados à *gfp* e expressos de forma transiente em células de epiderme de cebola mostram que ambas proteínas são direcionadas para o espaço extracelular pela via secretória (Figura 7). O sítio de clivagem do peptídeo sinal das SUGARWINs, entre os primeiros resíduos de alanina e glutamina, bem como o tamanho do peptídeo sinal: 31 e 26 aminoácidos para SUGARWIN1 e 2, respectivamente, mostram-se conservados entre outras proteínas do tipo barwin (LINTHORST et al., 1991; FRIEDRICH et al., 1991; CARUSO et al., 2001; AGRAWAL et al., 2003; ZHU; SONG; ZHENG, 2006).

O alto nível de similaridade das SUGARWINS com outras proteínas que possuem o domínio barwin sugere que a função desse domínio é conservada entre as plantas. A atividade antipatogênica documentada para as proteínas com o domínio barwin é condizente com sua localização no espaço extracelular, uma vez que fungos e bactérias têm crescimento lento e precisam colonizar o espaço extracelular antes de penetrar direta ou indiretamente no lúmen da

célula. A presença de uma proteína com ação antipatogênica no espaço extracelular e sua expressão restrita ao local de dano impediria o crescimento e colonização dos microorganismos.

Para complementar os estudos de expressão gênica, procurou-se elucidar a função das proteínas SUGARWINs. Para tanto, investiu-se na produção e purificação de sugarwins recombinantes em *E. coli*. A atividade antifúngica é documentada para homólogos das SUGARWINs, por exemplo, a proteína barwin, extraída de sementes de cevada tem atividade contra *Trichoderma harzianum* (HEJGAARD et al., 1992). No entanto, as duas isoformas não mostraram a atividade antifúngica esperada. SUGARWIN1 não afetou o crescimento micelial de *F. verticillioides* (Figura 9A) ou de *C. falcatum* (Figura 9B), embora a concentração usada (20 µg) seja superior à concentração de OsPR4b usada para inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani* (10 µg), testado por Zhu; Song e Zheng (2006). SUGARWIN2, na concentração de 200 µg/mL, não inibiu a germinação de esporos de *F. verticillioides* ou *C. falcatum* (Figura 13). Em trigo, Caruso e colaboradores (2001) mostraram que 40 µg/mL de wheatwin1 nativa e recombinante inibem o crescimento de *F. culmorum*. Um ponto importante salientado por Caruso et al. (2001) foi o restabelecimento da atividade antifúngica após a clivagem do aminoácido metionina (proveniente do vetor de clonagem) da parte N-terminal da proteína, e a posterior purificação da proteína através de RP-HPLC. O crescimento de hifas de *F. culmorum* foi avaliado na presença da proteína recombinante com ou sem a metionina N-terminal, usando a proteína nativa como controle. Os autores relatam que as proteínas recombinantes sem a metionina N-terminal foram capazes de inibir o crescimento do fungo com a mesma eficiência da proteína nativa. As proteínas recombinantes com a metionina N-terminal estavam inativas. A remoção dos aminoácidos extras da parte N-terminal da proteína SUGARWIN2 foi conduzida, no entanto, a eficiência da clivagem não foi satisfatória. A região N-terminal da proteína pode ter um papel importante no mecanismo antifúngico, assim, a presença de um resíduo extra pode prevenir a montagem correta da proteína e, portanto levar à ausência de atividade antifúngica. A clivagem eficiente dos aminoácidos da parte N-terminal e a posterior purificação através de RP-HPLC faz-se necessária para determinar a atividade das SUGARWINs.

A incorporação da SUGARWIN1 na dieta de *D. saccharalis* mostrou que não houve efeitos no desenvolvimento. As doses usadas (10 e 20 ppm) são superiores às encontradas em folhas ou sementes (1ppm) segundo Svensson et al. (1992) e Kiba et al. (2003), respectivamente. Os resultados confirmam a ausência de efeitos deletérios em lagartas da broca da

cana. A indução de genes do tipo barwin por herbivoria nunca foi relatada, somado a esse fato, o efeito de proteínas da família Barwin, como é o caso de SUGARWIN1, em parâmetros de desenvolvimento de insetos também nunca foi proposto. Em contraste, a indução de genes das heveínas pela alimentação de insetos foi caracterizada em estudos com microarranjos (REYMOND et al., 2000; LITTLE et al., 2007; KEMPEMA et al., 2007; MORAN et al., 2002). A atividade contra insetos é bem documentada para proteínas com o domínio lectina de ligação à quitina, como é o caso das heveína (ZHU-SALZMAN et al, 1998; HOPKINS; HARPER, 2001). O trato digestivo de insetos é recoberto com uma barreira protetora chamada matriz peritrófica, que é composta de uma matriz de quitina e proteína. A lectina pode se ligar à quitina da membrana peritrófica e desordenar sua morfologia (FITCHES, GATEHOUSE, 1998). Distúrbios na membrana plasmática podem interferir na absorção de nutrientes e predispor o inseto a patógenos e toxinas (ZHU-SALZMAN, LUTHE, FELTON, 2008).

A indução de transcritos e atividade da proteína contra insetos nunca foi descrita para a família Barwin. Esse é o primeiro estudo que caracteriza a indução de transcritos de dois homólogos de barwin de cana-de-açúcar em resposta ao ataque de lagartas de *D. saccharalis*. De acordo com os resultados mostrados, a análise filogenética do domínio barwin mostra similaridade com outras proteínas com função antipatogênica comprovada. Os resultados de localização subcelular no apoplasto e expressão gênica tardia e localizada ao local de dano sugerem uma função antifúngica para as SUGARWINS.

5.2 Identificação de serino proteases e inibidores de serino proteases de cana-de-açúcar induzidos e reprimidos por *D. saccharalis*

Neste trabalho foi confeccionado um macroarranjo contendo seqüências conhecidas de proteases e inibidores de proteases de cana-de-açúcar. A escolha das seqüências foi feita com base na homologia das seqüências de cana-de-açúcar com aquelas já descritas e caracterizadas em outras espécies de plantas no GenBank. O objetivo do trabalho foi selecionar, entre um universo de 248 seqüências serino proteases e inibidores de proteases de cana-de-açúcar, aquelas que estariam envolvidas com herbivoria. Identificando assim, genes candidatos para validação da expressão e estudos mais avançados, buscando, em última instância, um entendimento mais aprofundado da função desses genes na planta.

A maioria dos estudos de identificação e caracterização de proteínas com função na defesa foi conduzida com dicotiledôneas *A. thaliana*, tomate e *N. attenuata*. A comparação entre o conjunto serino proteases de *A. thaliana* e arroz (TRIPATHI; SOWDHAMINI, 2006) e de serino proteases de *A. thaliana*, arroz e cana-de-açúcar pode ser fundamental para o entendimento da sua função em espécies com o genoma ainda não completamente seqüenciado, como é o caso da cana-de-açúcar.

Aqui foi mostrado que a maioria dos genes induzidos por herbivoria foi representada pelos inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk, inibidor de proteinase de milho e inibidor de subtilisina. A indução por herbivoria de genes de cana-de-açúcar com similaridade a inibidores indica que esses genes são futuros candidatos à incorporação em programas de melhoramento ou mesmo para serem usados em estratégias transgênicas de piramidamento de inibidores de proteases, como já foi mostrado em maçã (MAHESWARAN et al., 2007), tomateiro (ABDEEN et al., 2005) e em cana-de-açúcar (FALCO; SILVA-FILHO, 2003).

A significância fisiológica de proteínas do tipo Bowman-Birk está associada com três funções nas plantas: regulação de proteinases de semente, reserva de aminoácidos sulfurosos e defesa contra patógenos e insetos (MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003). A função antinutritiva na proteção de plantas é atribuída à formação de complexos estáveis entre os inibidores e o sítio catalítico de proteases, o que bloqueia a degradação e ingestão de aminoácidos da dieta. *D. saccharalis* possui pH alcalino em seu trato digestivo, onde serino proteinases estão ativas (TERRA; FERREIRA, 1994). Quando inibidores de protease de soja semi-purificados foram incorporados em dieta de *D. saccharalis*, Pompermayer et al. (2001, 2003) mostraram que ocorrem atrasos no crescimento, desenvolvimento e queda de fecundidade. Em plantas transgênicas superexpressando os inibidores do tipo Bowman-Birk e Kunitz, Falco e Silva-Filho (2003) mostraram que lagartas de *D. saccharalis* sofreram diminuição na taxa de crescimento e metabolismo.

O inibidor de proteinase de milho (IPM) pertence à família dos inibidores de batata do tipo I. Desde 1982 foi constatado que em tomate, esses inibidores são induzidos por dano e que podem contribuir para a defesa contra o ataque de insetos (PLUNKETT et al., 1982). Em outras espécies de plantas, essa família tem membros atuando em várias vias bioquímicas, sendo induzida por inseto e ferimento (LEE et al., 1986; HEATH et al., 1997). Cordero, Raventós e San Segundo (1994) constataram que a expressão de IPM é diretamente proporcional ao dano, e há uma

indução local e sistêmica em resposta ao ferimento. IPM tem como alvo as proteases digestivas de lagartas de *S. littoralis* (TAMAYO et al., 2000). O nível de transcritos de *ipm* aumenta gradualmente até 24 h após o ataque de *S. exigua* e tratamento com metil jasmonato (FARAG et al., 2005).

Outro clone de cana-de-açúcar induzido por herbivoria teve similaridade ao inibidor de subtilisina-quimotripsina CI-1B de arroz. Em cevada, Wei, Wing e Wise (2002) sugerem que a família de inibidores de quimotripsina (CI-2) está associada com a resposta de defesa de cevada contra patógenos. Há relatos da indução de genes CI-2 por ácido salicílico e também por ácido jasmônico em cevada e milho, resultando em resistência aumentada a doenças (CORDERO; RAVENTÓS; SAN SEGUNDO, 1994; BESSER et al., 2000).

As proteases, comumente associadas a processos fisiológicos e reciclagem de aminoácidos, tiveram sua participação na defesa das plantas contra patógenos e insetos revelada recentemente (SCHALLER, 2004). A indução e repressão de serino proteases de cana-de-açúcar por herbivoria nunca tinha sido estudada. A caracterização da função das proteases aqui identificadas será de grande valia em estudos da interação-planta inseto. Pode-se identificar serino proteases com função antinutritiva ou que impeçam a correta absorção de nutrientes por *D. saccharalis*, como foi mostrado para a cisteíno protease Mir1-CP, identificada em linhagens resistentes de milho. Moran et al. (2006) mostraram que o gene da cisteíno protease é induzido rapidamente no local de dano. *S. frugiperda* alimentada com folhas das plantas resistentes teve seu crescimento diminuído devido à capacidade reduzida de utilização de nutrientes. A função de Mir1-CP foi estudada: essa protease ativamente danifica a membrana peritrófica de lagartas de vários insetos da ordem Lepidóptera.

As carboxipeptidases (família S10) tiveram representantes induzidos e reprimidos pela alimentação da broca-da-cana (Tabelas 3 e 4). Essa diferença no padrão de expressão deve ser investigada e pode ser um indicativo de diferentes funções. Em cevada, várias serino carboxipeptidases foram encontradas em diversos órgãos, o que sugere que essas peptidases têm diversas funções além de sua participação na mobilização de proteínas de reserva. (DAL DEGAN et al., 1994). De fato, as serino carboxipeptidases de plantas se mostram envolvidas com vários processos bioquímicos, incluindo mobilização de reservas durante germinação de sementes, morte celular programada, resposta a estresse, etc., o que tem sido atribuído à ampla especificidade de substrato (LEHFELDT et al., 2000; CERCOS; URBEZ; CARBONELL, 2003). A descoberta de

enzimas que facilitam a reação de transesterificação ao invés da proteólise, funcionando como aciltransferases, sugere que, no curso da evolução, algumas proteases do tipo serino carboxipeptidases podem ter sido recrutadas para funções não-proteolíticas em várias vias bioquímicas, principalmente no metabolismo secundário (PALMA et al., 2002; MILKOWSKI; STRACK, 2004). Com relação à provável participação de carboxipeptidases na defesa de plantas, em tomate foi caracterizada uma carboxipeptidase, que se mostrou induzida tardiamente (12 h depois) por ferimento mecânico, sistemina e metil jasmonato (MOURA; BERGEY; RYAN, 2001). Os autores propõem uma função na degradação de proteínas em resposta ao ferimento.

As subtilisinas (família S8) também tiveram representantes induzidos e reprimidos por herbivoria. A diferença de expressão das subtilisinas de cana precisa ser investigada. As funções propostas para esse grupo de proteases são bastante diversas, desde resposta a estresse, morte celular programada e desenvolvimento (BARRETT; RAWLINGS, 1995). Tamanha diversidade de função sugere que as subtilisinas de plantas, além da degradação, podem ter funções no processamento de proteínas precursoras em várias vias de transdução de sinal ou podem ter sido recrutadas para funções no metabolismo secundário de plantas (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006). Embora sem função conhecida, Tornero, Conejero e Vera (1996) identificaram uma proteína de tomate induzida por infecção por vírus que tem homologia com subtilisinas. Os autores relataram que a atividade dessa proteína aumenta na presença de íons de cálcio, e dos hormônios etileno e ácido salicílico.

Outras proteases induzidas e reprimidas por herbivoria (famílias S1, S14, S41, S54 e S9) não têm função documentada associada com defesa. Essas proteases têm função no desenvolvimento das plantas, participam do controle de qualidade de proteínas e da degradação de peptídeos nascentes mal-formados (PAGE; DI CERA, 2008).

A análise por macroarranjos de um grupo seletivo de transcritos de cana-de-açúcar provou ser uma técnica capaz de identificar genes potencialmente envolvidos com a defesa da planta ao ataque de *D. saccharalis*. Os genes aqui identificados podem servir como base para estudos mais aprofundados, como por exemplo, a localização subcelular das proteínas; a construção de plantas transgênicas que superexpressam ou silenciam genes selecionados para avaliar o seu efeito no desenvolvimento de insetos; a estabilidade de proteínas no trato digestivo de *D. saccharalis*; e a caracterização da regulação por múltiplos hormônios. Com o conjunto de informações então adquirido, poder-se-á elucidar prováveis interações e funções gênicas de interesse biotecnológico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Dois novos genes de cana-de-açúcar, *sugarwin1* e *sugarwin2* foram caracterizados quanto ao padrão de indução de transcritos por *D. saccharalis*, dano mecânico, inoculação com fungos e quanto à regulação por metil jasmonato. Esses estudos foram complementados com a localização subcelular e alinhamentos múltiplos de seqüências. Os resultados aqui apresentados mostram, pela primeira vez, que uma proteína de cana-de-açúcar, do tipo barwin é induzida por *D. saccharalis*. Embora sua função não esteja completamente elucidada, especula-se que as SUGARWINS possam ser proteínas recrutadas pela cana-de-açúcar para defesa contra patógenos oportunistas.

- Esse é o primeiro estudo em larga escala do monitoramento do nível de transcritos de serino proteases e inibidores de cana-de-açúcar em resposta a herbivoria. Os genes aqui identificados podem ser candidatos a estudos mais aprofundados, visando caracterizar sua função na planta, como por exemplo, a localização subcelular; o efeito da superexpressão ou silenciamento de proteínas no desenvolvimento de insetos; estabilidade de proteínas no trato digestivo de *D. saccharalis*; e a caracterização da principal via de sinalização que regula a expressão de proteases e inibidores de proteases.

REFERÊNCIAS

ABDEEN, A.; VIRGÓS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILÉS, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 189-202, 2005.

AGRAWAL, G.K.; JWA, N.-S.; HAN K.-S.; AGRAWAL, V.P.; RAKWAL, R. Isolation of a novel rice PR4 type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 81-90, 2003.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635 p.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARENCIBIA, A.; VAZQUEZ, R.I.; PRIETO, D. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, p. 247-255, 1997.

ARIKI, S.; KOORI, K.; OSAKI, T.; MOTOYAMA, K.; INAMORI, K.-I.; KAWABATA, S.-I. A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 953-958, 2004.

AUSUBEL, F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature immunology**, New York, v. 6, p. 973-979, 2005.

AZARKAN, M.; DIBIANI, R.; BAULARD, C.; BAEYENS-VOLANT, D. Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, London, v. 38, p. 216–224, 2006.

BALDWIN, I.T. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 8113–8118, 1998.

BALDWIN, I.T.; HALITSCHKE, R.; KESSLER, A.; SCHITTKO, U. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 351-358, 2001.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D. Families and clans of serine peptidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 318, p. 247-250, 1995.

BARSALOBRES, C.F. **Análise da expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via macroarranjos de colônias bacterianas.** 2004. 228 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BECKERS, G.J.M.; SPOEL, S.H. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, New York, v. 8, p. 1-10, 2006.

BEERS, E.P.; JONES, A.M.; DICKERMAN, A.W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. **Phytochemistry**, New York, v. 65, p. 43-58, 2004.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 340, p. 783-795, 2004.

BERGER, D.; ALTMANN, T. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in Arabidopsis thaliana. **Genes & Development**, New York, v. 14, p. 1119-1131, 2000.

BERGEY, D.R.; HOWE, G.A.; RYAN, C.A. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 12053-12058, 1996.

BERTINI, L.; LEONARDI, L.; CAPORALE, C.; TUCCI, M.; CASCONI, A.; DI BERARDINO, I.; BUONOCORE, V.; CARUSO, C. Pathogen-responsive wheat *PR4* genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding. **Plant Science**, Shannon, v. 164, p. 1067-1078, 2003.

BESSER, K.; JAROSCH, B.; LANGEN, G.; KOGEL, K.H. Expression analysis of genes induced in barley by chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, p. 277-286, 2000.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. **The Biochemical Journal**, London, v. 87, p. 281-284, 1963.

BOWER, N.I.; CASU, R.E.; MACLEAN, D.J.; REVERTER, A.; CHAPMAN, S.C.; MANNERS, J.M. Transcriptional response of sugarcane roots to methyl jasmonate. **Plant Science**, Shannon, v. 168, p. 761-772, 2005.

BOWMAN, D.E. Differentiation of soy bean antitryptic factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 63, p. 547-550, 1946.

BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, v.5, p. 209-222, 2003.

BRAVO, J.M.; CAMPO, S.; MURILLO, I.; COCA, M.; SAN SEGUNDO, B. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 745-759, 2003.

BROADWAY, R.M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 32, p. 39-53, 1996.

BROEKAERT, W.; LEE, H.-IL.; KUSHT, A.; CHUA, N.-H.; RAIKHEL, N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 7633-7637, 1990.

BROWSE, J.; HOWE, G.A. New weapons and a rapid response against insect attack. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 832-838, 2008.

CALLIS, J. Regulation of protein degradation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 45-857, 1995.

CARLINI C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, Oxford, v. 40, 1515-1539, 2002.

CARSON, D.L.; BOTHA, F.C. Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1769-1779, 2000.

CARSON, D.L.; HUCKETT, B.I.; BOTHA, F.C. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. **Plant Science**, Shannon, v. 162, p. 289-300, 2002.

CARUSO, C.; BERTINI, L.; TUCCI, M.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; SACCARDO, F.; BRESSAN, R.A.; VERONESE, P.; BUONOCORE, V. Isolation and characterisation of wheat cDNA clones encoding PR4 proteins. **DNA sequence: the journal of DNA sequencing and mapping**, London v. 10, p. 301-307, 1999.

CARUSO, C.; BERTINI, L.; TUCCI, M.; CAPORALE, C.; NOBILE, M.; LEONARDI, L.; BUONOCORE, V. Recombinant wheat antifungal PR4 proteins expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v. 23, p. 380-388, 2001.

CASU, R.E.; DIMMOCK, C.M.; THOMAS, M.; BOWER, N.; KNIGHT, D. Genetic and expression profiling in sugarcane. **Proceedings of the International Society for Sugar Cane Technology**, v. 24 p. 542-546, 2001.

CERCOS, M.; URBEZ, C.; CARBONELL, J. A serine carboxypeptidase gene (PsCP), expressed in early steps of reproductive and vegetative development in *Pisum sativum*, is induced by gibberellins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 165-174, 2003.

CHAO, W.S.; GU, Y.-Q.; PATOUT, V.; BRAY, E.A.; WALLING, L.L. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity and the wound signals systemin, methyl jasmonate and abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 979-992, 1999.

CHEN, H.; GONZALES-VIGIL, E.; WILKERSON, C.G.; HOWE, G.A. Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 1954-1967, 2007.

CHEN, H.; WILKERSON, C.; KUCHAR, J.A.; PHINNEY, B.S.; HOWE, G.A. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 19237- 19242, 2005.

CHEONG, Y.H.; CHANG, H.S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 661-677, 2002.

CHEVALIER, C.; BOURGEOIS, E.; PRADET, A.; RAYMOND, P. Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 28, p. 473-485, 1995.

CHRISTOPHER, M.E.; MIRANDA, M.; MAJOR, I.T.; CONSTABEL, C.P. Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. **Planta**, Berlin, v. 219, p. 936–947, 2004.

CONSTABEL, C.P.; YIP, L.; PATTON, J.J.; CHRISTOPHER, M.E. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 285-295, 2000.

CORDERO, M.J.; RAVENTÓS, D.; SAN SEGUNDO, B. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 141–150, 1994.

CREELMAN, R.A. E MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

CRUZ, I.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. **Pragas. Sistema de Produção, Embrapa Milho e Sorgo**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/prvegetativa.html>>. Acesso em: 4 maio 2007.

DAL DEGAN, F.; ROCHER, A.; CAMERON-MILLS, V. VON WETTSTEIN, D. The expression of serine carboxypeptidases during maturation and germination of the barley grain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 8209-8213, 1994.

DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, p. 826–833, 2001.

DE ROSA JR., V.E.; NOGUEIRA, F.T.S.; MENOSSE, M.; ULIAN, E.C.; ARRUDA, P. Identification of methyl jasmonate-responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, p. 173-180, 2005

DOARES, S.H.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; CONCONI, A.; RYAN, C.A. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1741-1746, 1995.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 953-971, 2007.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 300, p. 1005-1016, 2000.

FALCO, M.C., SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.41, p. 761–766, 2003.

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

FARAG, M.A.; FOKAR, M.; ZHANG, H.A.H.; ALLEN, R.D.; PARÉ, P.W. (Z)-3-Hexenol induces defense genes and downstream metabolites in maize. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 900–909, 2005.

FELIX, J.M.; DRUMMOND, R.D.; NOGUEIRA, F.T.S.; DE ROSA JUNIOR, V.E.; JORGE, R.A.; ARRUDA, P.; MENOSSI, M. Genoma Funcional: Uso de arranjos de DNA em nylon para a análise de expressão gênica em larga escala. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 24, p. 60-67, 2002.

FELTON, G.W. Indigestion is a plant's best defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 18771–18772, 2005.

FITCHES E.; GATEHOUSE, J.A. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 44, p. 1213-1224, 1998.

FRIEDRICH, L.; MOYER, M.; WARD, E.; RYALS, J. Pathogenesis related protein 4 is structurally homologous to the carboxyterminal domain of hevein, Win1 and Win2. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 230, p. 113-119, 1991.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. 3.ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 680 p.

GLAZE BROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

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

HALITSCHKE, R.; SCHITTKO, U.; POHNERT, G.; BOLAND, W.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 711-717, 2001.

HASELOFF, J.; SIEMERING, K.R.; PRASHER, D.C.; HODGE, S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 2122-2127, 1997.

HEATH, R.L.; MCDONALD, G.; CHRISTELLER, J.T.; LEE, M.; BATEMAN, K.; WEST, J.; VAN HEESWIJCK, R.; ANDERSON, M.A. Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, p. 833-842, 1997.

HEJGAARD, J.; JACOBSEN, S.; BJORN, S.E.; KRAGH, K.M. Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 307, p. 389-392, 1992.

HERMSMEIER, D.; SCHITTKO, U.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large scale changes in the accumulation of growth and defense-related plant mRNAs. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 683-700, 2001.

HOPKINS T.L.; HARPER, M.S. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. **Archives of insect biochemistry and physiology**, New York, v. 47, p.100-109, 2001.

HORN, M.; PATANKAR, A.G.; ZAVALA, J.A.; WU, J.; DOLECKOVÁ-MARESOVÁ, L.; VUJTECHOVÁ, M.; MARES, M.; BALDWIN, I.T. Differential elicitation of two processing proteases controls the processing pattern of the trypsin proteinase inhibitor precursor in *Nicotiana attenuata*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 375-88, 2005.

HOWE, G.A. Jasmonates as signals in the wound response. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, p. 223-237, 2005.

HOWE, G.A.; LIGHTNER, J.; BROWSE, J.; RYAN, C.A. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 2067-2077, 1996.

ISKANDAR, H.M.; SIMPSON, R.S.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 22, p. 325-337, 2004.

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

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induced Responses to Herbivory**. Chicago: Chicago Univ. Press, 1997. 319 p.

KAZAN, K.; SCHENK, P.M.; WILSON, I.; MANNERS, J.M. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.2, p. 177-185, 2001.

KEMPEMA, L.A.; CUI, X.; HOLZER, F.M.; WALLING, L.L. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 849-865, 2007.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 299-328, 2002.

KIBA, A.; SAITOH, H.; NISHIHARA, M.; OMIYA, K.; YAMAMURA, S. C-terminal domain of a hevein-like protein from *Wasabia japonica* has potent antimicrobial activity. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 296–303, 2003.

KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Eds.), **Handbook of Insect Rearing**. New York: Elsevier, 1985. p. 265–270.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, p. 379-384, 1997.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 370–378, 2004.

KOO, J.C.; LEE, S.Y.; CHUN, H.J.; CHEONG, Y.H.; CHOI, J.S.; KAWABATA, S.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; HA, K.S.; BAE, D.W.; HAN, C.D.; LEE, B.L.; CHO, M.J. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1382, p. 80-90, 1998.

KRÜGER, J.; THOMAS, C.M.; GOLSTEIN, C.; DIXON, M.S.; SMOKER, M.; TANG, S.; MULDER, L.; JONES, J.D.G. A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of tomato necrosis. **Science**, Washington, v. 296, p. 744–747, 2002.

KUNITZ, M.; Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. **Science**, Washington, v. 101, p. 668-669, 1945.

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

LEE, J.S.; BROWN, W.E.; GRAHAM, J.S.; PEARCE, G.; FOX, E.A.; DREHER, T.W.; AHERN, K.G.; PEARSON, G.D.; RYAN, C.A. Molecular characterization and phylogenetic studies of a wound-inducible proteinase inhibitor I gene in *Lycopersicon* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, p. 7277–7281, 1986.

LÉON, J.; ROJO, E.; SANCHEZ-SERRANO, J.J. Wound signaling in plants. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 52, p. 1-9, 2001.

LINTHORST, H.J.M.; DANHASH, N.; BREDERODE, F.T.; VAN KAN, J.A.L.; DE WIT, P.J.G.M.; BOL, J.F. Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the ‘hevein’ domain. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 4, p. 585–592, 1991.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G.S.; LIENER, I. Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 2, p. 410-414, 1954.

LITTLE, D.; GOUHIER-DARIMONT, C.; BRUESSOW, F.; REYMOND, P. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 784-800, 2007.

LUKASZEWICZ, M.; JÉROUVILLE, B.; BOUTRY, M. Signs of translational regulation within the transcript leader of a plant plasma membrane H(+)-ATPase gene. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, p. 413–423, 1998.

MA, H.M.; SCHULZE, S.; LEE, S.; YANG, M.; MIRKOV, E.; IRVINE, J.; MOORE, P.; PATERSON, A. An EST survey of the sugarcane transcriptome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108; 851-863, 2004.

MAHESWARAN, G.; PRIDMORE, L.; FRANZ, P.; ANDERSON, M.A. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. **Plant cell reports**, Berlin, v. 26, p. 773-782, 2007.

MAJOR, I.T.; CONSTABEL, C.P. Molecular analysis of poplar defense against herbivory. Comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. **The New Phytologist**, London, v. 172, p. 617-635, 2006.

MALECK, K.; DIETRICK, R.A. Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 215-219, 1999.

MATSUSHIMA, R.; HAYASHI, Y.; KONDO, M.; SHIMADA, T.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1807-1814, 2002.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, p. 71-81, 2002.

MELLO, M.O.; TANAKA, A.S.; SILVA-FILHO, M.C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 27, p. 103–112, 2003.

MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; SOUZA, G.M. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics**, Cairo, v. 2008, n. 458732, 2008. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/ijpg/>>. Acesso em: 12 jul. 2008.

MILKOWSKI, C.; STRACK, D. Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. **Phytochemistry**, New York, v. 65, p. 517-524, 2004.

MOELLER, D.A.; TIFFIN, P. Genetic diversity and the evolutionary history of plant immunity genes in two species of *Zea*. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 22, 2480-2490, 2005.

MOHAN, S.; MA, P.W.K.; PECHAN, T.; BASSFORD, E.R.; WILLIAMS, W.P.; LUTHE, D.S. Degradation of the *Spodoptera frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 52, p. 21-28, 2006.

MORAN, P.J.; CHENG, Y.F.; CASSELL, J.L.; THOMPSON, G.A. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 51, p. 182-203, 2002.

MOURA, D.S.; BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. Characterization and localization of a wound-inducible type I serine-carboxipeptidase from leaves of tomato plants (*Lycopersicum esculentum* Mill.). **Planta**, Berlin, v. 212, p. 222-230, 2001.

MOURA, D.S.; RYAN, C.A. Wound-inducible proteinase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 289-298, 2001.

NOGUEIRA, F.T.; DE ROSA V.E., JR; MENOSSI, M.; ULIAN, E.C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1811-1824, 2003.

OELMULLER, R.; HERRMANN, R.G.; PAKRASI, H.B. Molecular studies of CtpA, the carboxyl-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center in higher plants. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 21848-21852, 1996.

OGUNWOLU, E.O.; REAGAN, T.E.; FLYNN, J.L.; HENSLEY, S.D. Effects of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) damage and stalk rot fungi on sugarcane yield in Louisiana. **Crop Protection**, Guildford, v. 10, p. 57-61, 1991.

OROZCO-CARDENAS, M.; MCGURL, B.; RYAN, C.A. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 8273–8276, 1993.

PAGE, M.J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Birkhauser, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; JAVIER-CORPAS, F.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L.A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, 521-530, 2002

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VENCIO, R.Z., OLIVEIRA, K.C.; FELIX, J. DE M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C.S.; SIMÕES, A.C.; ULIAN, E.C.; DI MAURO, S.M.; DA SILVA, A.M.; PEREIRA, C.A.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, Tokyo, v. 12, p. 27-38, 2005.

PAUTOT, V.; HOLZER, F.M.; CHAUFaux, J.; WALLING, L.L. The induction of tomato aminopeptidase genes (LapA) after *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* infection is primarily a wound response triggered by coronatine. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 14, p. 214–224, 2001.

PAUTOT, V.; HOLZER, F.M.; REISCH, B.; WALLING, L.L. Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 9906-9910, 1993.

PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, Washington, v. 253, p. 895-898, 1991.

PECHAN, T.; COHEN, A; WILLIAMS, W.P.; LUTHE, D.S. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 13319-13323, 2002.

PECHAN, T.; YE, L.J.; CHANG, Y.M.; MITRA, A.; LIN, L.; DAVIS, F.M.; WILLIAMS, W.P.; LUTHE, D.S. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other lepidoptera. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1031–1040, 2000.

PEÑA-CORTÉS, H.; ALBRECHT, T.; PRAT, S.; WEILER, E.W.; WILLMITZER, L. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. **Planta**, Berlin, v. 191, p. 123-128, 1993.

PERRET, E.; FERRÁN, E.A.; MARINX, O.; LIAUZUN, P.; DUMONT, X.; FOURNIER, J.; KAGHAD, M.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Improved differential screening approach to analyze transcriptional variations in organized cDNA libraries. **Gene**, Amsterdam, v. 208, p. 103-115, 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 347-52, 1995.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PLUNKETT, G.; SENEAR, D.F.; ZUROSKE, G.; RYAN, C.A. Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 213, p. 463-472, 1982.

POMPERMAYER P. **Identificação e caracterização de um promotor de cana-de-açúcar induzido por herbivoria**. 2004. 142 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitors effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 109, p. 217-224, 2003.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, p. 79-85, 2001.

PONSTEIN, A.S.; BRES-VLOEMANS, S.A.; SELA-BUURLAGE, M.B.; VAN DEN ELZEN, P.J.M.; MELCHERS, L.S.; CORNELISSEN, B.J.C. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 109-118, 1994.

POTTER, S.; UKNES, S.; LAWTON, K.; WINTER, A.M.; CHANDLER, D.; DIMAIO, J.; NOVITZKY, R.; WARD, E.; RYALS, J. Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 6, p. 680-685, 1993.

PUJADE-RENAUD, V.; SANIER, C.; CAMBILLAU, L.; PAPPUSAMY, A.; JONES, H.; RUENGSR, N.; THARREAU, D.; CHRESTIN, H.; MONTORO, P.; NARANGAJAVANA, J. Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1727, p. 151-161, 2005.

RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRETT, A.J. *MEROPS*: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, p. 270-272, 2006.

REYMOND, P.; BODENHAUSEN, N.; VAN POECKE, R.M.P.; KRISHNAMURTHY, V.; DICKE, M.; FARMER, E.E. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 3132-3147, 2004.

REYMOND, P.; FARMER, E.E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 404-411, 1998.

REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E.E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 707-719, 2000.

RICE CHROMOSOMES 11 AND 12 SEQUENCING CONSORTIA. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications. **BMC Biology**, London, v.3, n. 20, 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/bmcbiol>>. Acesso em: 8 jul. 2008.

ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA, JR. M.Y.; VENCIO, R.Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, D.C.R.; DE ROSA, V.E. JR; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H.; RODRIGUES, F.A.; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI, S.M.; GALBIATTI, J.A.; ALMEIDA, R.S.; FIGUEIRA, A.V.; HEMERLY, A.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MENOSSE, M.; SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 71, 2007. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/bmcgenomics>. Acesso em: 8 jul. 2008.

ROSE, D. Microfluidic technologies and instrumentation for printing DNA microarrays. In: SCHENA, M. (Ed.) **Microarray Biochip Technology**, Natick: Eaton Publishing, BioTechniques Books Division, 2000. p. 19-37.

ROSS, M.T.; LABRIE, S.; MCPHERSON, J.; STANTON, V.P. Screening Large-Insert Libraries by Hybridization. In: DRACOPOLI, N.; HAINES, J.; KORF, B.; MOIR, D.; MORTON, C.; SEIDMAN, C.; SEIDMAN, J.; SMITH, D. (Eds.) **Current Protocols in Human Genetics**. New York: John Wiley and Sons, 1999. p. 5.6.1-5.6.52.

RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 7, p. 112-121, 2000.

RYAN, C.A.; MOURA, D.S. Systemic wound signaling in plants: A new perception **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 14, p. 6519–6520. 2002.

RYAN, C.A.; PEARCE, G. Polypeptide hormones. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 65-68, 2001.

RYAN, C.A.; PEARCE, G. Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 14577-14580, 2003.

RYAN, C.A.; WALKER-SIMMONS, M.K. Plant proteinases. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Eds). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1981, p. 321–350.

SALZMAN, R.A.; BRADY, J.A.; FINLAYSON, S.A.; BUCHANAN, C.D.; SUMMER E.J.; SUN, F.; KLEIN, P.E. ; KLEIN, R.R.; PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.M. ; MULLET, J.E. Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 352–368, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SARGENT TD. Isolation of differentially expressed genes. **Methods in enzymology**, New York, v. 152, p. 423-432, 1987.

SASABE, M.; TAKEUCHI, K.; KAMOUN, S.; ICHINOSE, Y.; GOVERS, F.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; YAMADA, T. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. **European Journal of Biochemistry/ FEBS**, Oxford, v. 267, p. 5005-5013, 2000.

SASAKI, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; SAKATA, K.; BABA, T.; KATAYOSE, Y.; et al. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. **Nature**, London, v. 420, p. 312-316, 2002.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 183-197, 2004.

SCHALLER, A.; RYAN, C.A. Identification of a 50-kDa systemin binding protein in tomato plasma membranes having Kex2p-like properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 11802-11806, 1994.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHMELZ, E.A.; CARROLL, M.J.; LECLERE, S.; PHIPPS, S.M.; MEREDITH, J.; CHOUREY, P.S.; ALBORN, H.T.; TEAL, P.E. Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 6, p. 8894-8899, 2006.

SCHUMMER, M.; BUMGARDNER, R.E.; NELSON, P.S.; SCHUMMER, B.; BEDNARSKI, D.W.; HASSELL, L.; BALDWIN, R.L.; KARLAN, B.Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Genetics**, Baltimore, v. 238, p. 375-385, 1999.

SCOTT, A.C.; WYATT, S.; TSOU, P.-L.; ROBERTSON, N.; ALLEN, N.S. Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. **Biotechniques**, London, v. 26, p. 1125-1132, 1999.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SHAH, J.; TSUI, F.; KLESSIG, D.F. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 10, p. 69-78, 1997.

SHEN, G.; PANG, Y.; LIN, C.; WEI, C.; QIAN, X.; JIANG, L.; DU, X.L.; LI, K.G.; ATTIA, K.; YANG, J.S. Cloning and characterization of a novel Hsp100/Clp gene (osClpD) from *Oryza sativa*. **DNA sequence**, London, v. 14, p. 285-293, 2003.

SHINDO, T.; VAN DER HOORN, R.A.L. Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 9, p. 119-125, 2008.

SMITH, C.M.; BOYKO, E.V. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 122, p. 1-16, 2007.

SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L.M.; THIEMANN, O.H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 296, p. 1194–1199, 2002.

SOUZA, G.M.; SIMÕES, A.C.Q.; OLIVEIRA, K.C.; GARAY, H.M.; COSTA, F.L.; DOS SANTOS GOMES F.E. ; NISHIYAMA-JR, M.Y.; DA SILVA, A.M. The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 25–34, 2001.

STANFORD, A.; BEVAN, M.; NORTHCOTE, D. Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 215, p. 200-208, 1989.

STEWART, E.J.; ASLUND, F.; BECKWITH, J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 17, p. 5543-5550, 1998.

STOTZ, H.U.; KOCH, T.; BIEDERMANN, A.; WENIGER, K.; BOLAND, W.; MITCHELL-OLDS, T. Evidence for regulation of resistance in Arabidopsis to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. **Planta**, Berlin, v. 214, p. 648–652, 2002.

STOTZ, H.U.; PITTENDRIGH, B.R.; KROYMANN, J.; WENIGER, K.; FRITSCH, J.; BAUKE, A.; MITCHELL-OLDS, T. Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of Arabidopsis against Egyptian cotton worm but not diamondback moth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1007–1018, 2000.

SVENSSON, B.; SVENDSEN, I.; HOJRUP, P.; ROEPSTORFF, P.; LUDVIGSEN, S.; POULSEN, F.M. Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. **Biochemistry**, Washington, v. 31, p. 8767-8770, 1992.

TAMAYO, M.C.; RUFAT, M.; BRAVO, J.M.; SAN SEGUNDO, B. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 62–71, 2000.

TANAKA, H.; ONOUCHI, H.; KONDO, M.; HARA-NISHIMURA, I.; NISHIMURA, M.; MACHIDA, C.; MACHIDA, Y. A subtilisin-like protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. **Development**, Cambridge, v. 128, p. 4681-4689, 2001.

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

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, p. 796-815, 2000.

THE RICE CHROMOSOME 10 SEQUENCING CONSORTIUM. In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. **Science**, Washington, v. 300, p. 1566-1569, 2003.

THOMMA, B.P.; EGGERMONT, K.; PENNINCKX, I.A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELSANG, R.; CAMMUE, B.P.; BROEKAERT, W.F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 15107-15111, 1998.

TIFFIN, P.; HACKER, R.; GAUT, B.S. Population genetic evidence for rapid changes in intraspecific diversity and allelic cycling of a specialist defense gene in *zea*. **Genetics**, Baltimore, v. 168, p. 425-434, 2004.

TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 6332–6337, 1996.

TRIPATHI, L.P.; SOWDHAMINI, R. Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and Rice. **BMC Genomics**, London, v. 7, n. 200, 2006. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/bmcgenomics>. Acesso em: 8 jul. 2008.

TURLINGS, T.C.J.; ALBORN, H.T.; LOUGHRIN, J.H.; TUMLINSON, J.H. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 1573-1561, 2000.

VAN DAMME, E.J.; CHARELS, D.; ROY, S.; TIERENS, K.; BARRE, A.; MARTINS, J.C.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F.; DOES, M.; PEUMANS, W.J. A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 1547-1556, 1999.

VAN DER HOORN, R.A.; JONES, J.D. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 400-407, 2004.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, Berlin, v. 183, p. 258-264, 1991.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, p. 484-487, 1995.

VENDRAMIM, J.D.; SILVA, F.C.; CAMARGO, A.P. Avaliação das dimensões da região danificada pelo complexo broca-podridões em seis cultivares de cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 18, p. 105-119, 1989.

VENDRAMIM, J.D.; SILVA, F.C.D.; CÉSAR, M.A.A.; CAMARGO, A.P.D. Intensity of damage a new index for evaluation of the borer-rot complex on sugarcane cultivars. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 20, p. 319-332, 1991.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; FERRO, M.I.; BACCI, JR, M.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.; SIQUEIRA, W.J.; VAN SLUYS, M.A.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; DE ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.; DE ROSA JR., V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.; BRAGA, M.D.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, New York, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made *SUCEST*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 1-7, 2001.

VICENTINI, R.; MENOSSI, M. Pipeline for macro and microarray analyses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 40, p. 615-619, 2007.

VIERSTRA, R.D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins, **Trends in Plant Science**, Kidlington, p. 135–142, 2003.

VOELCKEL, C.; BALDWIN, I.T. Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from stress combinations. **Plant journal**, Oxford, v. 38, p. 650–663, 2004.

WALLING, L.L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, p. 195-216, 2000.

WEI, F.; WING, R.A.; WISE, R.P. Genome dynamics and evolution of the Mla (powdery mildew) resistance locus in barley. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1903-1917, 2002.

WENG, L.; DENG, H.; XU, J.; LI, Q.; WANG, L.; JIANG, Z.; ZHANG, H.; LI, Q.; ZHANG, L. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 62, p. 178-187, 2006.

XIA, Y.; SUZUKI, H.; BOREVITZ, J.; BLOUNT, J.; GUO, Z.; PATEL, K.; DIXON, R.A.; LAMB, C. An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signalling. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 23, p. 980-988, 2004.

ZHAO, R.M.; MORIAU, L.; BOUTRY, M. Expression analysis of the plasma membrane H⁺-ATPase *pma4* transcription promoter from *Nicotiana plumbaginifolia* activated by the CaMV 35S promoter enhancer. **Plant Science**, Shannon, v. 149, p. 157–165, 1999.

ZHU, T.; SONG, F.; ZHENG, Z. Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 378–384, 2006.

ZHU-SALZMAN, K., SALZMAN, R.A.; AHN, J.-E.; KOIWA, H. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 420-431, 2004.

ZHU-SALZMAN, K.; LUTHE, D.S.; FELTON, G.W. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 852-858, 2008.

ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R.E.; KOIWA, H. SALZMAN, R.A.; NARASIMHAN, M.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M., MURDOCK, L.L. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 8, p. 15123-15128, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Sequência de iniciadores usados para PCR em tempo real quantitativo

	Iniciador forward	Iniciador reverse
<i>GAPDH</i>	5' TTT GAA TGG CAA GCT CAC TG	5' GGT GGA AAC CAA ATC CTC CT
<i>actin</i>	5' TCT ACG GCA ACA TTG TGC TC	5' TTG ATC TTC ATG CTG CTT GG
<i>sugarwin1</i>	5' GAA CGG GTG GAA CCT CAA C	5' CCG TTG GTG TCG ATC TTC TT
<i>sugarwin2</i>	5' CAC CTC ACC GTC AAC TAC CA	5' ACA TGT GCG GAT AGA TGC TG
<i>BBPI</i>	5' TGC ACC AAC TGC AAC TTC TC	5' GTG TCG GTG CAC TTG AAC AT

APÊNDICE 2 – Seqüência dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real, sublinhado encontra-se o sítio de anelamento dos iniciadores

sugarwin1 – tamanho do fragmento amplificado: 261 pares de bases

GAACGGGTGGAACCTCAACGCCGTCAGCGCCTACTGCGCCACGTGGGACGCCGACAA
GCCGCTGTCGTGGCGCCAGAAAGTACGGCTGGACGGCCTTCTGCGGGCCCGCCGGGCA
AAAGGGCCAGGCCGCCTGCGGCAAGTGCATCCGGGTGACGAACCGTGCGACGGGCG
CGTCCATCGTGGCGAGGATCGTGGACCAGTGCAGCAACGGCGGGCTGGACCTGGACT
ACGAGACGGTGTTCAAGAAGATCGACACCAACGG

sugarwin2 - tamanho do fragmento amplificado: 99 pares de bases

CACCTCACCGTCAACTACCAGTTCGTCAACTGCGGCGACAACCTGATGTCGTCATTCTT
CACTAGTATACGCATATGTAGCAGCATCTATCCGCACATGT

bbpi – tamanho do fragmento amplificado: 131 pares de bases

TGCACCAACTGCAACTTCTCCTTCTCGGGGCTCTACACCTGCGACGACGTCAAGAAGG
ACTGCGACCCCGTCTGCAAGAAGTGCCTCGCCGTGCAGACATACTCGGGCAAGATGT
TCAAGTGCACCGACAC

gapdh – tamanho do fragmento amplificado: 184 pares de bases

TTTGAATGGCAAGCTCACTGGTATGTTCTTCCGGGTTCACCGTGGATGTGTCGGTT
GTTGACCTCACTGTCAGAATTGAGAAGGGTGCCTCCTATGAGGAAATCAAGAAAGCT
ATTAAGGCTGCTTCTGAGGGCCCACTCAAGGGTATCATGGGCTACGTGGAGGAGGAT
TTGGTTTCCACC

APÊNDICE 3 – Sequência dos iniciadores usados para clonagem do peptídeo sinal da proteína de SUGARWIN1 e SUGARWIN 2 no vetor EN50PMA4- β K-GFP

	Iniciador forward	Iniciador reverse
SUGARWIN1	5'ATTAGATCTATGGCGGCG GCGGCGATCT	5'AATGGTACCGTACGTCGCCCCGCACGTT
SUGARWIN2	5'ATTAGATCTATGGCGGGG ATGACGACA	5'AATGGTACCGTAGGTGGCGCGCACGCC GGA

APÊNDICE 4 – Sequência dos iniciadores usados na expressão heteróloga de SUGARWIN1 e SUGARWIN2

	Iniciador forward	Iniciador reverse
SUGARWIN1	5'ATTCATATGCAGCAGGCCTCC AACGTGCGCGCGA	5'AACTCGAGTCAGCACGCCACGAACT G GTA
SUGARWIN2	5'AACAGCAGGCGAGCGGTGTT CGTGCCA	5'AACTCGAGTCAATTATCACCGCAGTT GACGAACT

APÊNDICE 5 – Sequência deduzida de aminoácidos de SUGARWIN1 e SUGARWIN2. O peptídeo sinal encontra-se sublinhado

SUGARWIN1

MAAAISGGRAAQALVVVAGVLCAVAGMAAAQQASNVRATYHYYNPQQNGWNLNA
VSAYCATWDADKPLSWRQKYGWTAFCGPAGQKGQAACGKCIRVTNRATGASIVARIVD
QCSNGGLDLDYETVFKKIDTNGQGYQMGHLNVNYQFVAC

SUGARWIN2

MAGMTTVSKLALAAVLLCAAAAMATAQQASGVRATYNYYNPTQNNWDLAGTYCATW
DAGQPLSWRSKYGWTAFCGPAGPTGQAACGQCLLVNTATGASLTVRIVDQCSNGGLD
LDYDTAFKPLDTNGAGIQAGHLTVNYQFVNCGDN