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

**Explorando as interações hospedeiro-parasitoide para a identificação de
moléculas com potencial biotecnológico**

Guilherme Duarte Rossi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2012**

Guilherme Duarte Rossi
Engenheiro Agrônomo

Explorando as interações hospedeiro-parasitoide para a identificação de moléculas com potencial biotecnológico

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Rossi, Guilherme Duarte

Explorando as interações hospedeiro-parasitoide para a identificação de moléculas com potencial biotecnológico / Guilherme Duarte Rossi. - - Piracicaba, 2012.

125 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Biotecnologia 2. Fluído do cálice 3. Glândula de veneno 4. Parasitoides
5. Regulação hospedeira 6. Teratócitos 7. Vírus de polidna I. Título

CDD 595.7
R832e

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

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fernando Luis Cnsoli pela orientao e pelas oportunidades de trabalho;

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Labate e Dra. Mnica Teresa Veneziano Labate, Departamento de Gentica, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelas orientaes no processo de transformao de plantas e pela disponibilizao de seu laboratrio;

Ao Professor Dr. Walter Ribeiro Terra, Departamento de Qumica, Universidade de So Paulo (USP), pela orientao nos ensaios enzimticos, sugestes e recepo em seu laboratrio;

A todos os professores e funcionrios do Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP, pelo aprendizado e convivncia;

Ao Juliano Ricardo Farias e ao Professor Dr. Celso Omoto, Laboratrio de Resistncia de Artrpodes s Tticas de Controle, e Neide Graciano Zrio, Patrcia Milano e ao Professor Dr. Jos Roberto Postali Parra, Laboratrio de Biologia de Insetos, Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP, pelo fornecimento de lagartas de *Heliothis virescens* e *Spodoptera frugiperda*, utilizadas nos ensaios de atividade da *Tnchi* recombinante;

Aos colegas do Laboratrio de Interaes em Insetos, pela companhia e ajuda;

 FAPESP pelo suporte financeiro (proc. 2007/59361-1);

A todos que, de alguma forma, tenham contribuído para a realizao desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
Referências	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Insetos parasitoides	23
2.2 Evolução da relação hospedeiro-parasitoide	24
2.3 Regulação hospedeira	24
Referências	26
3 EFEITOS NA FISIOLOGIA DIGESTIVA DE <i>Diatraea saccharalis</i> (F.) (Lepidoptera: Crambidae) CAUSADOS PELO PARASITISMO POR <i>Cotesia flavipes</i> (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)	31
Resumo	31
Abstract	32
3.1 Introdução	32
3.2 Material e métodos	34
3.2.1 Insetos	34
3.2.2 Índices nutricionais	34
3.2.3 Atividade enzimática	35
3.2.3.1 Preparo do extrato enzimático	36
3.2.3.2 Determinação do pH ótimo e da atividade enzimática	36
3.2.4 Efeito do parasitismo por <i>C. flavipes</i> no tempo de retenção de alimento no trato alimentar de lagartas de <i>D. saccharalis</i>	37
3.3 Resultados	38
3.3.1 Índices nutricionais	38
3.3.3 pH ótimo e atividade das enzimas do intestino de lagartas de <i>D. saccharalis</i> não-parasitadas e parasitadas por <i>C. flavipes</i>	39
3.3.4 Fluxo de alimento pelo tubo digestivo de lagartas parasitadas e não-parasitadas	40
3.4 Discussão	41
3.5 Conclusões	44

Referências.....	45
4 AVALIAÇÃO DE TRANSCRITOS DO OVÁRIO E GLÂNDULA DE VENENO DE <i>Cotesia flavipes</i> (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) ASSOCIADOS À REGULAÇÃO HOSPEDEIRA.....	49
Resumo.....	49
Abstract	49
4.1 Introdução	50
4.2 Material e métodos.....	52
4.2.1 Insetos	52
4.2.2 Obtenção dos ovários e da glândula de veneno de <i>C. flavipes</i>	52
4.2.3 Extração e quantificação de RNA.....	52
4.2.4 Construção das bibliotecas de cDNA.....	53
4.2.5 Clonagem em vetor pGEM	53
4.2.6 Reação de PCR e envio para sequenciamento	54
4.2.7 Análise dos ESTs	55
4.3 Resultados	55
4.4 Discussão	58
4.5 Conclusões	60
Referências.....	61
5 CARACTERIZAÇÃO DO cDNA E DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE DOIS FATORES LIGADOS À REGULAÇÃO DE <i>Diatraea saccharalis</i> (F.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) POR <i>Cotesia flavipes</i> (Cameron) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)	65
Resumo.....	65
Abstract	65
5.1 Introdução	66
5.2 Material e métodos.....	68
5.2.1 Insetos	68
5.2.2 Obtenção de teratócitos de <i>C. flavipes</i> para construção de biblioteca de cDNA	68
5.2.3 Construção e análise da biblioteca de cDNA de teratócitos de <i>C. flavipes</i>	69
5.2.4 Análise e caracterização dos transcritos da serpina e do fator de inibição da tradução do hospedeiro (HTIF) obtidos na biblioteca de cDNA de teratócitos de <i>C. flavipes</i>	70
5.2.5 Determinação do padrão de expressão do Cfserpina e CfHTIF ao longo do desenvolvimento do parasitoide.....	72
5.2.5.1 Parasitismo e coleta de tecidos.....	72

5.2.5.2 Síntese de cDNA e PCR semiquantitativo	72
5.3 Resultados.....	74
5.3.1 <i>Cf</i> serpina.....	74
5.3.2 <i>Cf</i> HTIF	78
5.4 Discussão.....	81
5.4.1 <i>Cf</i> Serpina	81
5.4.2 <i>Cf</i> HTIF	83
5.5 Conclusões.....	84
Referências	85
6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E EXPLORAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE UMA PROTEÍNA ASSOCIADA AO PARASITOIDE <i>Toxoneuron nigriceps</i> (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae)	91
Resumo	91
Abstract.....	91
6.1 Introdução.....	92
6.2 Material e métodos	94
6.2.1 Transformação de plantas de fumo.....	96
6.2.1.1 Subclonagem do inserto <i>Tnchi</i> do vetor pENTR-D-TOPO para o vetor pK7WG2D	96
6.2.1.2 Preparo de células eletrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> e transformação com os vetores pK7WG2D+ <i>Tnchi</i> e pK7WG2D.....	97
6.2.1.3 Incubação das plantas com <i>A. tumefaciens</i> para infecção e transferência do cDNA <i>Tnchi</i>	98
6.2.1.4 Obtenção de plantas de fumo homozigotas contendo o inserto <i>Tnchi</i>	99
6.2.1.5 Extração de DNA das plantas transformadas e para confirmação da presença do inserto <i>Tnchi</i>	100
6.2.1.6 Detecção da transcrição do inserto <i>Tnchi</i> em plantas T ₁	101
6.2.1.7 Bioensaios de atividade inseticida das plantas transformadas com o inserto <i>Tnchi</i>	102
6.2.1.8 Atividade de quitinase nas folhas de plantas transformadas com o inserto <i>Tnchi</i> e controle	102
6.2.2 Expressão heteróloga da proteína <i>Tnchi</i> em <i>E. coli</i>	103
6.2.2.1 Subclonagem do inserto <i>Tnchi</i> para o vetor de expressão heteróloga pDEST17.....	103
6.2.2.2 Avaliação da expressão da proteína <i>Tnchi_rec</i>	104
6.2.2.3 Teste para verificar a solubilidade da proteína <i>Tnchi_rec</i>	104
6.2.2.4 Solubilização e renaturação da proteína <i>Tnchi_rec</i>	105

6.2.2.5 Ensaio de atividade quitinolítica da proteína <i>Tnchi_rec</i>	106
6.2.2.6 Ensaio de atividade lisozimática da proteína <i>Tnchi_rec</i>	108
6.2.2.7 Ensaio de ligação da proteína <i>Tnchi_rec</i> a diferentes políssacarídeos.....	108
6.2.2.8 Atividade antimicrobiana da proteína <i>Tnchi_rec</i>	109
6.2.2.9 Atividade inseticida da proteína <i>Tnchi_rec</i> a lagartas <i>Heliothis virescens</i>	109
6.3 Resultados	110
6.3.1 Transformação de plantas de fumo	110
6.3.2 Expressão heteróloga da proteína <i>Tnchi</i> em <i>E. coli</i>	111
6.4 Discussão	116
6.5 Conclusões	119
Referências	120

RESUMO

Explorando as interações hospedeiro-parasitoide para a identificação de moléculas com potencial biotecnológico

Parasitoides criam condições favoráveis para seu desenvolvimento regulando processos fisiológicos do hospedeiro via a utilização de moléculas produzidas por tecidos maternos ou por tecidos derivados do parasitoide imaturo ou de simbiontes associados (vírus de poliDNA - PDV). Assim, essas moléculas se destacam como uma fonte preciosa para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de pragas. O objetivo desse trabalho foi o de explorar a interação hospedeiro-parasitoide, visando à identificação de moléculas que participem do processo de regulação hospedeira para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de pragas. A busca pela identificação dessas moléculas foi concentrada na interação *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) – *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) pela avaliação i) do efeito do parasitismo na fisiologia digestiva do hospedeiro e ii) da contribuição da glândula de veneno e do ovário na produção de moléculas bioativas e iii) pela caracterização de transcritos produzidos por teratócitos desse parasitoide. O potencial de aplicação de moléculas derivadas da interação hospedeiro-parasitoide foi verificado pela caracterização da atividade de uma quitinase putativa isolada da associação *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) – *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae), via expressão heteróloga e transformação genética de plantas de fumo. Os resultados demonstraram que o parasitismo afeta a utilização do alimento por lagartas parasitadas, reduzindo as taxas de crescimento (RGR), consumo (RCR) e metabólica (RMR) relativas, enquanto aumenta a eficiência de conversão do digerido (ECD). O parasitismo por *C. flavipes* também aumentou a permanência do alimento no intestino do hospedeiro e a atividade de α -amilase, sacarase e trealase em lagartas de *D. saccharalis*. Análises do transcriptoma da glândula de veneno e do ovário de *C. flavipes* indicaram a produção de muitas proteínas desconhecidas. Porém, foi possível identificar proteases, um inibidor de proteinase e uma proteína com ação antimicrobiana, produzidas pela glândula de veneno, e uma proteína de expressão precoce (*ep1*), como produto do ovário de *C. flavipes*. Dois transcritos isolados de teratócitos de *C. flavipes* foram putativamente identificados como serpina e fator de inibição da tradução (*CfHTIF*). Ambos os transcritos foram detectados em teratócitos após cinco dias do parasitismo, sendo que transcritos do *CfHTIF* também foram observados em hemócitos de hospedeiros parasitados. *CfHTIF* apresentou alta homologia a proteínas produzidas por PDVs associados a outras espécies de *Cotesia*, sugerindo a sua origem viral, sendo este o primeiro relato da utilização de teratócitos para a produção de proteínas virais voltadas à regulação hospedeira. A caracterização da atividade da quitinase de teratócitos de *T. nigriceps* e a avaliação do seu potencial biotecnológico via transgenia de plantas para o controle de lagartas de *H. virescens* indicou que, apesar dessa quitinase possuir capacidade de ligação à quitina coloidal e cristalina em ensaios *in vitro*, a mesma não demonstra qualquer atividade quitinolítica. Avaliações de plantas de fumo transformadas com o *Tnchi* não indicaram qualquer efeito deletério ao desenvolvimento de lagartas de *H. virescens*. Apesar da ausência de atividade quitinolítica, essa quitinase apresentou atividade antimicrobiana. A possibilidade de exploração dessa proteína na produção de plantas de interesse econômico é discutida.

Palavras-chave: Biotecnologia; Glândulas de veneno; Ovários; Regulação hospedeira; Teratócitos

ABSTRACT

Exploiting the host – parasitoid interactions for the identification of molecules with biotechnological potential

Parasitoids regulate their host's physiological processes in order to produce suitable conditions for their own development by employing molecules produced by maternal tissues, the immature parasitoid and derived tissues, and associated symbionts (polydnavirus – PDV). These molecules represent, therefore, an untapped resource of new molecules for the development of alternative pest control methods. Our objective was to exploit the host-parasitoid interactions aiming at the identification of molecules involved in host regulation for their use in the development of alternative strategies for pest control. The search for new molecules was concentrated on the interaction *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) – *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) by assessing i) the effects of parasitization on the host digestive physiology and ii) the contribution of the venom gland and ovary in producing regulatory molecules, and by iii) the characterization of cDNAs isolated from teratocytes of *C. flavipes*. The potential application of molecules from host-parasitoid associations was verified by characterizing the activity of a putative chitinase isolated from the interaction *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) – *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) using recombinant proteins and genetically-modified tobacco plants. Data obtained demonstrated parasitized larvae had reduced relative growth (RGR), consumption (RCR) and metabolic (RMR) rates, while an increased efficiency in the conversion of the digested food (ECD) was obtained as compared to unparasitized larvae. Larvae parasitized by *C. flavipes* retained the food in the gut for a longer period and had higher activities for α -amylase, saccharase and trehalase if compared to control larvae. Analysis of the transcriptome of the venom gland and ovary of *C. flavipes* predicted a large number of unknown proteins. Nevertheless, several proteases, a protease inhibitor and an antimicrobial protein from the venom gland, and an early-expressed protein (*ep1*), with a putative role in the process of host regulation from the ovaries, were identified. Two cDNAs isolated from teratocytes of *C. flavipes* were putatively identified as a serpin and an eukaryote translation inhibitory factor (*CfHTIF*). Both were detected in teratocytes from day 5 of parasitism and onwards, with the *CfHTIF* being also detected in hemocytes of parasitized hosts. Comparative analysis of the *CfHTIF* indicated it is highly homologous to host translation inhibitory factors produced by PDVs associated with other species of *Cotesia*, indicating its possible viral origin and suggesting this to be the first record of teratocytes as a source of PDV-derived proteins for host regulation. The characterization of the activity from the chitinase isolated from teratocytes of *T. nigriceps* (*Tnchi*) and the evaluation of its biotechnological potential via plant transgenesis to control larvae of *H. virescens* indicated this chitinase can bind to colloidal and crystalline chitins in *in vitro* assays, but it does not display chitinolytic activity. Assays with transformed tobacco plants expressing *Tnchi* did not result in any effect to *H. virescens* larval development and survival. Although *Tnchi* did not have any chitinolytic activity, it did show to have an antimicrobial effect. The possible exploitation of this protein for production of economically-important plants is discussed.

Keywords: Biotechnology; Host regulation; Ovaries; Teratocytes; Venom gland

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 - Efeito do pH na atividade relativa (%) de enzimas do trato digestivo de *D. saccharalis*. A) α -amilase; B) sacarase; C) trealase; D) tripsina.....39
- Figura 3.2 - Efeito do parasitismo por *Cotesia flavipes* na atividade específica (U/mg de proteína) (média±erro médio) de enzimas do intestino médio de lagartas de 6º ínstar de *Diatraea saccharalis* em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 3, 5, 7 e 9 dias). (♦) Lagartas não-parasitadas e (□) parasitadas por *Cotesia flavipes*. A = α -amilase, B = sacarase, C = trealase, D = tripsina. (*) representa diferença significativa entre valores do mesmo intervalo de desenvolvimento, segundo teste *t* de Student ($P \leq 0,05$).....40
- Figura 4.1 - Função putativa para os ESTs da glândula de veneno de *Cotesia flavipes*. Números indicam a quantidade de sequências em cada categoria.....55
- Figura 4.2 - Função predita dos ESTs avaliados de ovários de *Cotesia flavipes*. Números indicam a quantidade de sequências em cada categoria.....57
- Figura 5.1 - Sequência de nucleotídeos (minúsculas) e de aminoácidos (maiúsculas) da serpina putativa (Cfserpina) de teratócitos de *Cotesia flavipes*. Sequência nucleotídica: região não traduzida da terminação 5' (UTR-5') – em negrito; códon de inicialização de leitura (ATG) -sublinhado simples; códon de finalização de leitura - sublinhado duplo, região não traduzida da terminação 3'(UTR-3') – em itálico. Na sequência peptídica: peptídeo sinal - em negrito; domínio 2 antitrombina - marcado em cinza; domínio 1 antitripsina - marcado em preto; sítio catalítico conservado de serpinas - marcado em preto, com aminoácidos em negrito.....76
- Figura 5.2 - Alinhamento múltiplo do centro reativo da Cfserpina de teratócitos de *C. flavipes* com o de outras serpinas de insetos disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta MUSCLE. “↓” indica a posição de clivagem da serpina pela proteinase-alvo, “*” = posições com resíduos idênticos, “:” = posições com substituições conservadas, “.” = posições com substituições semi-conservadas. As sequências destacadas em cinza são serpinas com função predita ou que comprovadamente inibem a cascata de melanização. Ag = *Anopheles gambiae*; Dm = *Drosophila melanogaster*; Hc = *Hyphantria cunea*; Lb = *Leptopilina boulardi*; Ms = *Manduca sexta*; Nv = *Nasonia vitripennis*; Cf = *Cotesia flavipes*.....77
- Figura 5.3 - Caracterização temporal da expressão do transcrito Cfserpina em teratócitos de *Cotesia flavipes* ao longo do desenvolvimento do parasitoide em lagartas de *Diatraea saccharalis*.....78

- Figura 5.4 - Sequência de nucleotídeos (minúsculas) e de aminoácidos (maiúsculas) do fator de inibição da tradução (*Cf*HTIF) isolado de teratócitos de *Cotesia flavipes*. Sequência nucleotídica: região não traduzida da terminação 5' (UTR-5') – em negrito; códon de inicialização de leitura (ATG) - sublinhado simples; códon de finalização de leitura - sublinhado duplo, região não traduzida da terminação 3' (UTR-3') – em itálico. Na sequência peptídica: peptídeo sinal - em negrito.....79
- Figura 5.5 - Alinhamento múltiplo da proteína *Cf*HTIF com fatores de inibição da tradução em hospedeiros (HTIF) produzidos por vírus de poliDNA (PDV) associados a outras espécies de parasitoides do gênero *Cotesia*, utilizando a ferramenta ClustalW. “*” = posições com resíduos idênticos, “:” = posições com substituições conservadas, “.” = posições com substituições semiconservadas. Sequências de HTIF utilizadas no alinhamento são identificadas pelo seu número de acesso (sigla entre parênteses) e são oriundas da análise do genoma dos vírus de poliDNA associados aos parasitoides *Cg* = *Cotesia glomerata* e *Cp* = *Cotesia plutellae*.....80
- Figura 5.6 - Caracterização temporal da expressão do transcrito do fator de inibição da tradução do hospedeiro (*Cf*HTIF) de *Cotesia flavipes* em teratócitos (Δ) e hemócitos ($\diamond$) coletados de lagartas de *Diatraea saccharalis* ao longo do parasitismo.....81
- Figura 6.1 - Reação de PCR gene-específico com os iniciadores GateF e GateR indicando a presença do inserto *Tnchi* nas plantas de fumo transformadas (1-10) e ausência no DNA da planta transformada controle (11); M: marcador 1kb (Invitrogen).....110
- Figura 6.2 - Reação de RT-PCR gene-específica com os iniciadores GateF e GateR indicando a transcrição do inserto *TnChi* nas plantas T_0 com segregação 3:1 para resistência a canamicina (50 mg/L) (M: marcador 100 pb - Amresco; 1: Planta controle; 2: Planta T_02 ; 3: Planta T_05 ; 4: Planta T_08 ; 5: Planta T_09 ; 6: Planta T_010).....111
- Figura 6.3 - Perfil protéico das células de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pDEST17+*Tnchi* separados em SDS-PAGE a 7,5% [M: Marcador de peso molecular BioRad Broad Range; 1: Cultivo não-induzido 0 h; 2: Cultivo 0 h após indução da expressão (aie); 3: Cultivo não-induzido 1,5 h; 4: Cultivo 1,5 h aie; 5: Cultivo não-induzido 3 h; 6: Cultivo 3 h aie; 7: Cultivo não-induzido 4 h; 8: Cultivo 4 h aie].....112
- Figura 6.4 - Perfil protéico do cultivo de *E. coli* BL 21+*Tnchi* 4 h após indução da expressão com 0,2% L-arabinose [M: Marcador de peso molecular BioRad Broad Range (kDa); 1: Extrato bruto (frações solúvel e insolúvel); 2: Extrato bruto controle; 3: Fração insolúvel; 4: Fração insolúvel controle; 5: Fração solúvel; 6: Fração solúvel controle]. Seta indica proteína *Tnchi_rec*.....112

- Figura 6.5 - Solubilização dos corpos de inclusão em diferentes condições de pH [M: Marcador de peso molecular Biorad Broad Range (kDa); 1: Fração insolúvel e 2: Fração solúvel após solubilização em 8 M uréia, pH=7,5; 3: Fração insolúvel e 4: Fração solúvel após processo de solubilização em 8 M uréia, pH = 10,0].....113
- Figura 6.6 - Quantidade (%) de proteína *Tnchi_rec* sedimentada após incubação de 50 µg de proteína a 4°C por 1 h com 10 mg de quitina coloidal preparada em diferentes pHs.....115
- Figura 6.7 - Multiplicação de células de *E. coli* mantidas em meio LB líquido acrescido da proteína *Tnchi* recombinante (100 µg/mL) (◇) ou não (□). Cultivo a 37°C sob agitação constante (200 rpm).....115
- Figura 6.8 - Curva de crescimento de células de *E. coli* em meio LB incubado a 37°C e 200 rpm com diferentes concentrações da proteína *Tnchi_rec* adicionada ao meio de cultivo. ◇: 0 µg/mL (controle), □: 50 µg/mL, Δ: 100µg/mL, ○: 200µg/mL.....116

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Enzimas avaliadas, condições dos ensaios e método de detecção da atividade enzimática do intestino de lagartas de <i>D. saccharalis</i> não-parasitadas e parasitadas por <i>C. flavipes</i>	37
Tabela 3.2 -	Efeito do parasitismo por <i>Cotesia flavipes</i> nos índices nutricionais de lagartas de último instar de <i>Diatraea saccharalis</i> criadas em dieta artificial a base de farelo de soja e germe de trigo ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; 14 h de fotofase).....	38
Tabela 4.1 -	Identificação, tamanho, valor de referência e função putativa dos ESTs da glândula de veneno de <i>C. flavipes</i> pela ferramenta Blast2Go.....	56
Tabela 4.2 -	Identificação, tamanho, valor de referência, proteína predita e função predita para os ESTs do ovário de <i>C. flavipes</i> via ferramenta de análise Blast2Go.....	57
Tabela 4.3 -	Identificação, tamanho, organismo de referência, número de acesso do e valor de similaridade para ESTs do ovário de <i>C. flavipes</i> similares a sequências nucleotídicas de PDVs associados a diferentes espécies de <i>Cotesia</i>	58

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção agrícola necessitam alternativas de controle de pragas que contornem os efeitos negativos causados pelo controle químico, cuja utilização predomina nos campos de produção até os dias atuais. Táticas alternativas ao controle químico, como o uso de inimigos naturais para o controle de insetos, de plantas com ação alelopática para controle de plantas daninhas, de “vacinação” para conferir resistência a viroses, entre outras, podem ser integradas a sistemas de manejo e estão em constante desenvolvimento (BAUM et al., 2007; OOI, 2005; ZEHNDER et al., 2007).

A transgenia de plantas também recebe destaque como uma das alternativas viáveis ao controle de pragas, já sendo utilizada em larga escala em inúmeros países (PARK et al., 2011). Desde o desenvolvimento desta tecnologia (HERRERA-ESTRELLA et al., 1983; BEVAN; FLAVELL; CHILTON, 1983; FRALEY et al., 1983), as plantas transgênicas evoluíram muito e progridem no sentido de se tornar tão eficazes e acessíveis como o controle químico convencional, oferecendo como vantagens a inocuidade aos organismos não-alvo e a redução da exposição do Homem e ambiente aos resíduos tóxicos. Além disso, a utilização da transgenia traz a interessante possibilidade de transferência de informação genética entre seres sexualmente incompatíveis (MOELLER; WANG, 2008).

Por esse motivo, distintas fontes de moléculas com potencial inseticida têm sido estudadas para fornecer os subsídios necessários para a inserção de informação genética exógena no genoma de plantas de interesse econômico, tornando-as resistentes, por exemplo, a insetos-praga (BAUM et al., 2007; BECKAGE; GELMAN, 2004;)

Muitos exemplos de moléculas inseticidas de diferentes origens expressas em plantas transgênicas podem ser encontrados. Como representante de moléculas inseticidas de origem microbiana, destacam-se as proteínas *Cry* isoladas de linhagens de *Bacillus thuringiensis* (GATEHOUSE, 2008). No reino vegetal, aparecem os inibidores de proteases digestivas (DUNAEVSKY et al., 2005) e as lectinas (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011) e, no reino animal, mais especificamente na classe Insecta, têm-se como exemplo a quitinase do fluido da ecdise de *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) (DING et al., 1998) e o peptídeo regulador da biossíntese de tripsina, derivado do ovário de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (TORTIGLIONE et al., 2002).

Dado que o desenvolvimento de organismos transgênicos para o controle de pragas depende da eficiência do inserto utilizado, a busca por eventos que tenham modo de ação distintos daqueles normalmente utilizados é fundamental para o desenvolvimento e

manutenção desta tecnologia. Dessa forma, várias são as investigações buscando a identificação e avaliação de organismos como fonte de moléculas que possam vir a ser utilizadas para esta finalidade. Insetos parasitoides, por exemplo, têm sido propostos como uma possível fonte de moléculas novas que possam ser empregadas para esta finalidade (BECKAGE; GELMAN, 2004), já tendo sido demonstrada a aplicação eficiente dessas informações para a transgenia de plantas no controle de insetos pragas, para pelo menos uma das moléculas identificadas desses organismos (MAITI et al., 2003).

Parasitoides se destacam como possível fonte de moléculas com ação inseticida devido à sua diversidade biológica e de estratégias de exploração hospedeira (PENNACHIO; STRAND, 2006; VINSON; IWANTSCH, 1980). As diferentes estratégias de utilização hospedeira envolvem a produção de inúmeras toxinas e moléculas reguladoras que atuam na regulação de diversos mecanismos fisiológicos do hospedeiro, permitindo o controle do seu crescimento, desenvolvimento, resposta imunológica, metabolismo, entre outros (PENNACCHIO; STRAND, 2006; VINSON, IWANTSCH, 1980; VINSON, PENNACCHIO, CÔNSOLI, 2001), as quais se mostram como uma excelente fonte de moléculas com potencial de exploração biotecnológica para diversos fins (BECKAGE; GELMAN, 2004; WANG; YANG, 2008).

Assim, este trabalho tem por objetivo estudar a interação *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) – *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) e os diferentes recursos utilizados por este parasitoide na regulação de seu hospedeiro, com o intuito de se compreender tal processo e, conseqüentemente, obter novas opções para serem exploradas por meio de ferramentas biotecnológicas no controle de insetos-praga ou em outros processos de interesse, bem como avaliar as propriedades e o potencial de uma molécula derivada de um tipo celular específico associado ao parasitoide *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae), caracterizada como uma quitinase (CÔNSOLI et al., 2005; 2007), no controle de insetos via transgenia de plantas.

Referências

- BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.
- BECKAGE, N.E.; GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.49, p.299-330, 2004.
- BEVAN, M.W.; FLAVELL, R.B.; CHILTON, M-D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selective marker for plant cell transformation. **Nature**, London, v. 304, n. 5922, p. 184-187, 1983.
- CÔNSOLI, L.F.; BRANDT, S.L.; COUDRON, T.A.; VINSON, S.B. Host regulation and release of parasitism specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps-Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, Oxford, v.142B, n. 2, p. 181-191, 2005.
- CÔNSOLI, F.L.; LEWIS, D.; KEELEY, K; VINSON, S.B. Characterization of a cDNA encoding a putative chitinase from teratocytes of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 122, n. 3, p. 271-278, 2007.
- DING, X.; GOPALAKRISHNAN, B.; JOHNSON, L.B.; WHITE, F.F.; WANG, X.; MORGAN, T.D.; KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. **Transgenic Research**, London, v. 7, n. 2, p. 77-84, 1998.
- DUNAEVSKY, Y.E.; ELPIDINA, E.N.; VINOKUROV, K.S.; BELOZERSKY, M.A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. **Molecular Biology**, New York, v. 39, n. 4, p. 608-613, 2005.
- FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; HORSH, R.B.; SANDERS, P.R.; FLICK, J.S.; ADAMS, S.P.; BITTNER, M.L.; BRAND, L.A.; FINK, C.L.; FRY, J.S.; GALLUPPI, G.R.; GOLDBERG, S.B.; HOFFMAN, N.L.; WOO, S.C. Expression of bacterial genes in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 80, n. 15, p. 4803-4807, 1983.
- GATEHOUSE, J.A. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 146, n. 3, p. 881-887, 2008.
- HERRERA-ESTRELLA, A.; DEPICKER, A.; MONTAGU, M. VAN; SCHELL, J. Expression of chimaeric genes transferred into plants using a Ti-plasmid-derived vector. **Nature**, London, v. 303, n. 5914, p. 209-213, 1983.
- MAITI, I.B.; DEY, N.; PATTANAIK, S.; DAHLMAN, D.L.; RANA, R.L.; WEBB, B.A. Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 209-219, 2003.

MOELLER, L.; WANG, K. Engineering with precision: tools for the new generation of transgenic crops. **Bioscience**, Washington, v.58, n.5, p.391-401, 2008.

OOI, P.A.C. (Ed.) **Nonpesticide methods for controlling diseases and insect pests**. Tokyo: Asian Productivity Organization, 2005. 179 p.

PARK, J.R.; MCFARLANE, I.; PHIPPS, R.H.; CEDDIA, G. The role of transgenic crops in sustainable development. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 2–21, 2011.

PENNACCHIO, F.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 233-258, 2006.

TORTIGLIONE, C.; FANTI, P.; PENNACCHIO, F.; MALVA, C.; BREUER, M.; LOOF, A. de; MONTI, M.; TREMBLAY, E.; RAO, R. The expression in tobacco plants of *Aedes aegypti* Trypsin Modulating Oostatic Factor (Aea-TMOF) alters growth and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 9, n. 3, p. 159-169, 2002.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; DAMME, E.J.M.V. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, New York, v. 72, n. 13, p.1538–1550, 2011.

VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.

VINSON, S.B.; PENNACCHIO, F.; CÔNSOLI, F.L. The parasitoid–host interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific, 2001. p. 187-205.

WANG, X.; YANG, Z. Ecological mechanisms and prospects for utilization of toxins from parasitic hymenopterans. **Frontiers of Forestry in China**, Beijing, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2008.

ZEHNDER, G.; GURR, G.M.; KÜHNE, S.; WADE, M.R.; WRATTEN, S.D.; WYSS, E. Arthropod pest management in organic crops. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 57-80, 2007.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Insetos parasitoides

Os insetos parasitoides são organismos cujo desenvolvimento imaturo ocorre de forma parasítica, utilizando outros insetos como fonte de alimento. Diferente dos hospedeiros dos parasitas, os hospedeiros dos parasitoides não sobrevivem ou são incapazes de gerar progênie (HAWKINS, 1994; VINSON; IWANTSCH, 1980). Parasitoides apresentam desenvolvimento peculiar, formando um grupo de grande sucesso evolutivo, sendo encontrados em maior número na ordem Hymenoptera, representando 20% das espécies da classe Insecta (PENNACCHIO; STRAND, 2006). Parasitoides atacam os mais diversos tipos de hospedeiros nos mais variados habitats, explorando hospedeiros em diferentes estágios de desenvolvimento e utilizando estratégias adaptadas às diferentes associações hospedeiras (BOIVIN, 2010; PENNACCHIO; STRAND, 2006). Esta diversidade na capacidade de exploração hospedeira se dá pelo desenvolvimento de estratégias eficientes para a localização e seleção de hospedeiros (BRODEUR; VET, 1995; SCHRÖDER; HILKER, 2008; VET; DICKE, 1992; VINSON, 1976; VINSON, 1998), assim como para a sua utilização (HARVEY et al., 2004; JERVIS; ELLERS; HARVEY, 2008; VINSON; IWANTSCH, 1980; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001).

Assim, parasitoides podem ser agrupados quanto ao estágio de desenvolvimento do hospedeiro (parasitoide de ovo, larva/ninfa, pupa ou adulto), quanto à sua localização (interna ao hospedeiro – endoparasitoide; externa ao hospedeiro – ectoparasitoide) e interação com o hospedeiro (idiobionte ou cenobionte) (MACKAUER; SEQUEIRA, 1993; QUICKE, 1997). Parasitoides idibiontes são aqueles que se desenvolvem em hospedeiros imóveis, que tem o seu desenvolvimento paralisado, como, por exemplo, via injeção de venenos, enquanto os cenobiontes permitem a movimentação e crescimento do hospedeiro (MACKAUER; SEQUEIRA, 1993). Parasitoides cenobiontes podem ainda ser agrupados em “reguladores” ou “conformers”. No primeiro caso, o parasitoide regula o desenvolvimento de seu hospedeiro para atender às suas próprias exigências de desenvolvimento, enquanto que no segundo, parasitoides ajustam o seu desenvolvimento ao do hospedeiro parasitado (LAWRENCE, 1986; VINSON; IWANTSCH, 1980).

2.2 Evolução da relação hospedeiro-parasitoide

Observando dados filogenéticos, ecológicos, fisiológicos e moleculares, os ectoparasitoides idiobiontes são reconhecidos como os parasitoides de estratégia de desenvolvimento menos evoluída. Esses parasitoides injetam veneno paralisante e se desenvolvem externamente ao hospedeiro, ficando expostos a condições adversas, como à ação de predadores e hiperparasitoides ou às condições climáticas desfavoráveis, ao não permitir a movimentação do hospedeiro como estratégia de manipulação do desenvolvimento do mesmo (PENNACHIO; STRAND, 2006).

O próximo passo evolutivo na relação hospedeiro-parasitoide foi permitir a movimentação do hospedeiro após o parasitismo. Os ectoparasitoides cenobiontes desenvolveram venenos não-paralisantes ou temporariamente paralisantes, os quais permitem a movimentação do hospedeiro após o início do parasitismo. Também passaram a inviabilizar a troca de tegumento pelo hospedeiro como mecanismo de regulação hospedeira, fato extremamente benéfico aos ectoparasitoides (PENNACHIO; STRAND, 2006).

Com o decorrer da evolução, além de utilizar seus hospedeiros como fonte de alimento, os parasitoides também passaram a utilizá-los como abrigo. Dessa forma, endoparasitoides tiveram que contornar os efeitos do sistema de defesa imunológico do hospedeiro para colonizar a sua hemocela (PENNACHIO; STRAND, 2006). Inicialmente, os endoparasitoides agiam como idiobiontes, parasitando seus hospedeiros em fases sésseis de desenvolvimento (ovo, pupa), as quais apresentam sistema imunológico menos desenvolvido. Com a evolução do parasitismo, parasitoides desenvolveram estratégias para manipular sistemas imunológicos mais complexos, e endoparasitoides passaram a se desenvolver no interior de hospedeiros capazes de se locomover e se alimentar (cenobiontes) (PENNACHIO; STRAND, 2006).

2.3 Regulação hospedeira

Em função de sua estratégia de desenvolvimento, parasitoides possuem necessidades distintas de intervenção nas condições fisiológicas naturais de seus hospedeiros e podem atuar como “conformers” (se adaptam ao desenvolvimento do hospedeiro), “reguladores” (alteram o desenvolvimento do hospedeiro) ou podem possuir ambas as características em momentos

distintos (BECKAGE, 1997; LAWRENCE, 1986; VINSON; IWANTSCH, 1980; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001).

Ao interagir com seus hospedeiros, parasitoides precisam contornar os efeitos do sistema imunológico e alterar as condições fisiológicas do hospedeiro para tornar o ambiente propício ao seu desenvolvimento em detrimento do desenvolvimento do hospedeiro (STRAND; PECH, 1995; VINSON; IWANTSCH, 1980).

As alterações de desenvolvimento induzidas em hospedeiros por parasitoides são definidas pelo termo “regulação hospedeira” (VINSON; IWANTSCH, 1980). A regulação hospedeira pode implicar em diversas alterações nas características naturais do hospedeiro, como mudanças na sua atividade celular e humoral (STRAND; PECH, 1995; COLINET et al., 2009), no teor de nutrientes acumulados no tecido adiposo ou em circulação (SALVADOR; CÔNSOLI, 2008), no comportamento alimentar (THOMPSON; REDAK, 2005), na concentração hormonal e no desenvolvimento de órgãos responsáveis pela síntese de hormônios (BECKAGE; REED; GELMAN, 1998; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 2009; TANAKA; VINSON, 1991), no desenvolvimento de órgãos reprodutivos (BAI et al., 2009; BROWN; REED-LARSEN, 1991), entre outros.

Por pertencerem à mesma classe filogenética de seus hospedeiros, parasitoides podem sintetizar, na forma de veneno ou de secreções, a maioria ou, possivelmente, todos os hormônios e substâncias neuroativas utilizadas no controle do desenvolvimento do hospedeiro (ADAMO; LINN; BECKAGE, 1997). Parasitoides possuem diversos recursos aplicados à regulação hospedeira, como as substâncias produzidas pela glândula de veneno (NAKAMATSU; TANAKA, 2003) e epitélio do ovário (ASGARI et al., 1998; NALINI et al., 2009; VINSON, 1972), ambas originadas em tecidos associados às fêmeas de parasitoides, e aquelas oriundas de células derivadas da serosa do ovo do parasitoide, teratócitos (CACCIA et al., 2011; DAHLMAN, 1990; NAKAMATSU; FUJII; TANAKA, 2002; QIN; GONG; DING, 2000), e de secreções larvais (FUEHRER; WILLERS, 1986; HOCHULI; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 1999; KAESLIN et al., 2006). Além dessas fontes de moléculas bioativas, evidenciam-se as associações de simbiose com vírus de poliDNA, fundamentais no processo de regulação hospedeira, agindo, principalmente, na supressão do sistema imunológico do hospedeiro (BECKAGE, 1998; KROEMER; WEBB, 2004; LAVINE; BECKAGE, 1995).

Referências

ADAMO, S.A.; LINN, C.E.; BECKAGE, N.E. Correlation between changes in host behavior and octopamine levels in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, parasitized by the gregarious braconid parasitoid wasp *Cotesia congregata*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, p. 117-127, 1997.

ASGARI, S.; THEOPOLD, U.; WELLBY, C.; SCHMID, O. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 7, p. 3690-3695, 1998.

BAI, S-F.; CAI, D-Z., LI, X.; CHEN, X-X. Parasitic castration of *Plutella xylostella* larvae induced by polydnaviruses and venom of *Cotesia vestalis* and *Diadegma semiclausum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 70, n. 1, p. 30-43, 2009.

BECKAGE, N.E. New insights: how parasites and pathogens alters the endocrine physiology and development of insect hosts, In: BECKAGE, N.E (Ed.). **Parasites and pathogens: effects on host hormones and behavior**. London: Chapman & Hall, 1997. chap. 1, p. 3-36.

_____. Parasitoids and polydnaviruses. **BioScience**, Washington, v. 48, n. 4, p. 305-311, 1998.

BECKAGE, N.E.; REED, D.A.; GELMAN, D.B. Manipulation of fifth-instar host (*Manduca sexta*) ecdysteroid levels by the parasitoid wasp *Cotesia congregata*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, n. 9, p. 833-843, 1998.

BOIVIN, G. Phenotypic plasticity and fitness in egg parasitoids. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 4, p. 457-463, 2010.

BRODEUR, J.; VET, L.E.M. Relationships between parasitoid host range and host defense: a comparative study of egg encapsulation in two related parasitoid species. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 7-12, 1995.

BROWN, J.J.; REED-LARSEN, D. Ecdysteroids and insect host/parasitoid interactions. **Biological Control**, Orlando, v. 1, n. 2, p. 136-143, 1991.

CACCIA, S.; GRIMALDI, A.; CASARTELLI, M.; FALABELLA, P.; EGUILEOR, M.; PENNACCHIO, F.; GIORDANA, B. Functional analysis of a fatty acid binding protein produced by *Aphidius ervi* teratocytes. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 2012. In press.

COLINET, D.; DUBUFFET, A.; CAZES, D.; MOREAU, S.; DREZEN, J.; POIRIE, M. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 33, n. 6, p. 681-689, 2009.

DAHLMAN, D.L. Evaluation of teratocyte functions: an overview. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3/4, p. 159-166, 1990.

FUEHRER, E.; WILLERS, D. The anal secretion of the endoparasitic larva *Pimpla turionellae*: sites of production and effects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 361-367, 1986.

HARVEY, J.A.; BEZEMER, T.M.; ELZINGA, J.A.; STRAND, M.R. Development of the solitary endoparasitoid *Microplitis demolitor*: host quality does not increase with host age and size. **Ecological Entomology**, London, v. 29, n. 1, p. 35-43, 2004.

HAWKINS, B.A. **Pattern and process in host-parasitoid interactions**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 190 p.

JERVIS, M.A.; ELLERS, J.; HARVEY, J.A. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 53, n. 3, p. 361-85, 2008.

HOCHULI, A.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Analysis of endoparasitoid-released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae) *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 823-833, 1999.

KAESLIN, M.; WYLER, T.; GROSSNIKLAUS-BÜRGIN, C.; LANZREIN, B. Development of the anal vesicle, salivary glands and gut in the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus*: tools to take up nutrients and to manipulate the host? **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 269-281, 2006.

KROEMER, J.A.; WEBB, B.A. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 431-456, 2004.

LAVINE, M.D.; BECKAGE, N.E. Polydnaviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 368-378, 1995.

LAWRENCE, P.O. Host-parasite hormonal interactions: an overview. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 295-298, 1986.

MACKAUER, M.; SEQUEIRA, R. Patterns of development in insect parasites. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. New York: Academic Press, 1993. chap. 1, p. 1-20.

NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 149-159, 2003.

NAKAMATSU, Y.; FUJII, S.; TANAKA, T. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 48, n. 11, p. 1041-1052, 2002.

- NALINI, M.; IBRAHIM, A.M.A.; HWANG, I.; KIM, Y. Altered actin polymerization of *Plutella xylostella* (L.) in response to ovarian calyx components of an endoparasitoid *Cotesia plutellae* (Kurdjumov). **Physiological Entomology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 110-118, 2009.
- PENNACCHIO, F.M.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 233-258, 2006.
- PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Stage dependent influences of polydnviruses and the parasitoid larva on host ecdysteroids. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 55, n. 8, p. 707-715, 2009.
- QIN, Q.L.; GONG, H.; DING, T. Two collagenases are secreted by teratocytes from *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) cultured *in vitro*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 76, n. 1, p. 79-80, 2000.
- QUICKE, D.L.J. **Parasitic wasps**. London: Chapman & Hall, 1997. 470 p.
- SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F.L. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, Orlando, v. 45, n. 1, p. 103-110, 2008.
- SCHRÖDER, R.; HILKER, M. The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. **BioScience**, Washington, v. 58, n. 4, p. 308-316, 2008.
- STRAND, M.R.; PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p.31-56, 1995.
- TANAKA, T.; VINSON, S.B. Depression of prothoracic gland activity of *Heliothis virescens* by venom and calyx fluids from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 139-144, 1991.
- THOMPSON, S.N.; REDAK, R.A. Feeding behaviour and nutrient selection in an insect *Manduca sexta* L. and alterations induced by parasitism. **Journal of Comparative Physiology**, New York, v. 191, n. 10, p. 909-923, 2005.
- VET, L.E.M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 141-172, 1992.
- VINSON, S.B. Effect of the parasitoid, *Campoletis sonorensis*, on the growth of its host *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1509-1514, 1972.
- _____. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 21, p. 109-133, 1976.
- _____. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. **Biological Control**, Orlando, v. 11, n. 2, p. 79-96, 1998.

VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.

VINSON, S.B.; PENNACCHIO, F.; CÔNSOLI, F.L. The parasitoid–host interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific, 2001. p. 187-205.

3 EFEITOS NA FISIOLOGIA DIGESTIVA DE *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) CAUSADOS PELO PARASITISMO POR *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Resumo

Parasitoides são organismos capazes de manipular a fisiologia do hospedeiro para a criação de condições favoráveis ao seu próprio desenvolvimento, sendo a relação hospedeiro-parasitoide muito estudada para o entendimento dos mecanismos pelos quais parasitoides fazem uso de seus hospedeiros. A compreensão dos efeitos do parasitismo na aquisição, digestão e utilização do alimento, e os mecanismos de regulação envolvidos, são fundamentais ao entendimento do processo de desenvolvimento do parasitoide e podem ter implicações práticas, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de dietas artificiais para criação *in vitro* de parasitoides ou para o desenvolvimento de táticas de controle de pragas, por exemplo. A proposta desse trabalho foi avaliar a ocorrência de alterações na fisiologia digestiva de lagartas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) parasitadas por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). Assim, estudos comparativos entre lagartas de último instar parasitadas e não-parasitadas foram realizados para se verificar o efeito do parasitismo nos diferentes índices nutricionais do hospedeiro. Paralelamente, também foi avaliada a atividade enzimática de carboidrases (α -amilase, trealase e sacarase) e proteinases do intestino médio de lagartas de *D. saccharalis* ao longo do parasitismo (1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo - DAP). Lagartas parasitadas sofreram alterações em vários dos índices nutricionais, apresentando menor taxa de consumo (RCR), taxa metabólica (RMR) e taxa de crescimento (RGR) relativo do que lagartas não-parasitadas. No entanto, a eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) foi superior em lagartas parasitadas, não havendo qualquer diferença na eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) ou na digestibilidade aproximada (AD). As alterações nos índices nutricionais foram acompanhadas por mudanças significativas na atividade das carboidrases no intestino médio de lagartas de *D. saccharalis*. Enquanto a atividade dessas carboidrases seguiu padrão decrescente após 3 DAP em lagartas não-parasitadas, sacarase e trealase apresentaram atividade crescente até o término do desenvolvimento do parasitoide, atingindo atividade máxima aos 9 DAP. Já as α -amilases diferiram do controle apenas aos 7 DAP. Nenhuma diferença na atividade de proteinases foi observada entre lagartas parasitadas e não-parasitadas, ao longo de todo o desenvolvimento do parasitoide. Também foi observado que a movimentação do alimento pelo trato digestivo de lagartas parasitadas foi muito mais lenta do que em lagartas não-parasitadas. A retenção do bolo alimentar por período prolongado no trato digestivo de lagartas parasitadas em relação àquelas não-parasitadas pode estar relacionada à maior eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), mesmo que com índices reduzidos de RCR e RGR. As alterações causadas e suas implicações na fisiologia digestiva de *D. saccharalis* são discutidas.

Palavras chave: Enzimas digestivas; Parasitoide; Regulação hospedeira

Abstract

Parasitoids are organisms that can manipulate the physiology of their hosts to produce the suitable conditions required to sustain their own development, making the host-parasitoid interaction an interesting source of resources for understanding mechanisms parasitoids employ to utilize their hosts. Understanding how parasitoids affect food consumption, digestion and utilization by their hosts and the mechanism they use to achieve such regulation are key to provide insights on the needs for parasitoid development and on how such information can be exploited to support the implementation of alternative strategies for pest control. Therefore, the goal of this research was to evaluate if the larval parasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) can affect the digestive physiology of the host, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), by comparative assessment of the nutritional indices of parasitized and non-parasitized last instars of *D. saccharalis*. The effects of parasitism on the enzymatic activity of carbohydrases (α -amilase, trehalase and sacarase) and proteinases from the midgut of last instars of *D. saccharalis* during parasitoid development (1, 3, 5, 7 and 9 d after parasitization - DAP) were also assessed. Food utilization by parasitized larvae was affected as they displayed reduced relative consumption (RCR), relative metabolic (RMR) and relative growth (RGR) rates if compared to control larvae. However, parasitized larvae had a higher efficiency for conversion of the digested food (ECD) than control larvae, without any difference for the efficiency in the conversion of the ingested food (ECI) and approximate digestibility (AD). The alterations in the nutritional indices of parasitized larvae were followed by changes in the activity of carbohydrases of the midgut. The activity of the sacarase and trehalase in the midgut of parasitized larvae increased continuously with the parasitoid development, peaking at 9 DAP, while in control larvae, they peaked at 3 DAP and had a continuous decrease towards to the end of parasitoid development. Differences in the α -amilase activity between control and parasitized larvae were detected only at 7 DAP. No difference in the activity of proteinases was detected between treatments. Parasitism was also shown to affect the food flow within the food canal of the host by increasing the time the food remained within the gut. The reduction in the food flow within the gut of parasitized larvae may be related with the higher ECD observed for parasitized larvae, despite their reduced RCR and RGR. The possible implications of the alterations induced on the *D. saccharalis* larval digestive parasitized by *C. flavipes* are discussed.

Keywords: Digestive enzymes; Host regulation; Parasitoid

3.1 Introdução

Hospedeiros de parasitoides cenobiontes representam uma porção de recursos nutricionais sujeita a grandes variações em sua composição, dada às alterações qualitativas e quantitativas do alimento consumido pelos mesmos, e às próprias alterações fisiológicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, que alteram o balanço dos nutrientes disponíveis e as decisões de alocação desses nutrientes (VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001). Para explorar com sucesso essa fonte nutricional dinâmica (o hospedeiro), parasitoides se utilizam de uma diversidade de moléculas que atuam na regulação de inúmeros aspectos da fisiologia do hospedeiro, interferindo no consumo do alimento, utilização de

nutrientes, desenvolvimento e crescimento de tecidos do hospedeiro, por exemplo, visto que as células do hospedeiro se constituem nos maiores competidores dos imaturos dos parasitoides por nutrientes (revisado por VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001).

As alterações induzidas no hospedeiro por inimigos naturais são bastante variáveis dependendo da natureza da associação e da estratégia de desenvolvimento do parasitoide (endo/ectoparasitoides, solitários/gregários, ceno/idiobionte), visto as exigências nutricionais e de desenvolvimento específicas do parasitoide às quais o hospedeiro deve atender (SCHMIDT, 2006). As alterações necessárias ao atendimento das exigências nutricionais do parasitoide são induzidas por mecanismos diversos, que envolvem moléculas bioativas presentes no fluído do cálice e veneno de fêmeas do parasitoide, ou produzidas por teratócitos ou partículas virais simbiotes (vírus de poliDNA) do parasitoide, que infectam tecidos do hospedeiro para a produção de moléculas ligadas à regulação do mesmo (BECKAGE; GELMAN, 2004; PENNACCHIO; STRAND, 2006; SCHAFELLNER; MARKTL; SCHOPF, 2007; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001). Assim, são comuns os relatos de alterações na fisiologia do hospedeiro induzidas pelo parasitismo e que estão diretamente relacionadas à utilização de nutrientes, como a aceleração ou retardo da metamorfose, a inibição do desenvolvimento pupal e do desenvolvimento de órgãos reprodutivos, entre outros (HUANG et al., 2008; JONES, 1996; STRAND; PECH, 1995; SALVADOR; CÔNSOLI, 2008; VINSON; IWANTSCH, 1980). Sendo assim, sistemas hospedeiro-parasitoide em que alterações no consumo e utilização de recursos alimentares são observadas, representam uma fonte potencial para a i) investigação dos mecanismos de consumo e utilização de nutrientes por insetos-praga passíveis de regulação e ii) descoberta de moléculas bioativas que possam ser empregadas no desenvolvimento de métodos de controle de pragas.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o de verificar o efeito do parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) no consumo e utilização do alimento de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) para identificar a possível existência de mecanismos de regulação hospedeira nesta associação para a posterior exploração das moléculas bioativas envolvidas, além de fornecer subsídios para melhor entender as relações existentes na interação *D. saccharalis* – *C. flavipes*.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Insetos

A criação de *D. saccharalis* foi realizada em dieta artificial a base de milho e germe de trigo (PARRA; MIHSFELDT, 1992) em condições controladas ($28\pm1^{\circ}\text{C}$; $60\pm10\%$ UR; fotofase de 14 h), seguindo o procedimento de criação descrito por Parra (1999).

A criação estoque de *C. flavipes* foi mantida oferecendo lagartas de terceiro/quarto instares de *D. saccharalis* para parasitismo. As lagartas selecionadas eram oferecidas às fêmeas do parasitoide e transferidas para recipientes de criação contendo dieta de realimentação após o parasitismo por uma única fêmea de *C. flavipes* (PARRA, 1999). As lagartas parasitadas foram mantidas nas mesmas condições controladas descritas anteriormente até a formação dos casulos do parasitoide, os quais eram transferidos para recipientes limpos, onde permaneciam até a emergência. Os adultos de *C. flavipes* foram alimentados com solução aquosa de mel (10%) embebida em algodão até a sua utilização para o parasitismo de lagartas de *D. saccharalis*.

3.2.2 Índices nutricionais

Para a determinação do efeito do parasitismo por *C. flavipes* no consumo e utilização do alimento por lagartas de *D. saccharalis*, lagartas de *D. saccharalis* na premuda do quinto para o sexto instar (último instar) foram selecionadas, pesadas e subdivididas em dois grupos. Um dos grupos foi sujeito ao parasitismo por *C. flavipes* (apenas uma oviposição/lagarta) (lagartas parasitadas: P), enquanto o outro foi mantido como controle (lagartas não-parasitadas: NP). As lagartas foram então transferidas individualmente para recipientes contendo quantidade definida de dieta artificial e mantidas nas condições controladas de criação descritas anteriormente para avaliação após 12 h. Apenas as lagartas P e NP que realizaram a muda para o último instar após este intervalo foram mantidas no experimento para posterior avaliação dos índices nutricionais. Os tratamentos contaram com 27 a 29 repetições, sendo cada lagarta considerada uma repetição, para a determinação dos índices nutricionais.

Os índices nutricionais foram obtidos com base no peso seco dos parâmetros necessários aos cálculos. Assim, para a determinação do peso seco inicial de lagartas e do alimento oferecido, amostras de lagartas e de alíquotas de dieta artificial semelhantes àquelas

utilizadas no experimento foram separadas, pesadas e secas em estufa a 60°C até atingirem peso seco constante. Os valores de peso fresco e seco de cada amostra utilizada foram utilizados para análise de correlação para determinação de curva de regressão para estimar o peso seco das amostras a partir do peso fresco averiguado. Para a determinação do peso fresco máximo atingido pelas lagartas, as mesmas foram submetidas a pesagens duas vezes ao dia, sendo utilizado o último valor obtido antes da transformação em pupa (lagartas não-parasitadas) ou egressão das larvas do parasitoide (lagartas parasitadas). O peso seco da dieta remanescente e o peso seco das fezes produzidas durante o período de alimentação foi determinado após secagem do material em estufa até a obtenção de peso constante. Os índices nutricionais foram determinados de acordo com as avaliações gravimétricas de Waldbauer (1968), seguindo as recomendações de Parra (1991), sendo realizados os seguintes cálculos:

- **Taxa de consumo relativo (RCR)** (mg/mg/dia) = $I/B_m \times T$, a qual indica a quantidade de alimento ingerido em relação ao peso corpóreo do inseto por dia;
- **Taxa metabólica relativa (RMR)** (mg/mg/dia) = $M/B_m \times T$, a qual indica a quantidade de alimento gasta em metabolismo em relação ao seu peso durante o período de avaliação;
- **Taxa de crescimento relativo (RGR)** (mg/mg/dia) = $B/B_m \times T$, a qual indica o ganho de biomassa em relação ao seu peso médio;
- **Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI)** (%) = $(B/I) \times 100$, a qual indica a porcentagem de alimento ingerido convertida em biomassa;
- **Eficiência de conversão do alimento digerido (ECD)** (%) = $(B/I-F) \times 100$, a qual indica a porcentagem de alimento digerido convertida em biomassa;
- **Digestibilidade aproximada (AD)** (%) = $(I-F/I) \times 100$, a qual indica a porcentagem de alimento ingerido assimilada pelo inseto, sendo utilizada na manutenção do metabolismo ou revertida para ganho de peso, sendo:

T = tempo de duração do período de alimentação, I = alimento consumido durante T , B = alimento utilizado durante T [$B = (I-F)-M$], F = alimento não-digerido+fezes, M = alimento metabolizado durante T [$M = (I-F)-B$] e B_m = peso médio das lagartas durante T .

Os dados obtidos foram submetidos a comparação de médias pelo teste t ($P < 0,05$), utilizando o programa R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

3.2.3 Atividade enzimática

Para a determinação do efeito do parasitismo por *C. flavipes* na atividade de enzimas associadas ao intestino de lagartas de *D. saccharalis*, lagartas foram selecionadas assim como

descrito anteriormente. Um grupo de lagartas foi submetido ao parasitismo, sendo as lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) tratadas assim como detalhado anteriormente. Lagartas P e NP foram amostradas em diferentes períodos do desenvolvimento, equivalentes a 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo (DAP), e dissecadas para a obtenção do intestino para a produção de extratos enzimáticos a serem utilizados na determinação da atividade enzimática do trato digestivo.

3.2.3.1 Preparo do extrato enzimático

As lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) foram lavadas superficialmente em água destilada, secas em papel absorvente, pesadas, imobilizadas em gelo por 10 min e dissecadas em solução salina (125 mM NaCl, 4°C) para a remoção do intestino. Os intestinos dissecados foram homogeneizados em água destilada (4°C) com o auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem na proporção de seis intestinos/mL de água (4°C). Essa solução foi centrifugada (10.000g e 4°C por 10 min), o sobrenadante (= extrato enzimático) foi coletado e armazenado a -20°C até sua utilização nas análises. Cada conjunto de seis intestinos constituiu uma repetição. Foram realizadas três repetições por tratamento (P e NP) para cada período amostral (1, 3, 5, 7 e 9 DAP).

3.2.3.2 Determinação do pH ótimo e da atividade enzimática

O extrato enzimático foi diluído de forma a se obter resultados lineares de atividade em relação aos intervalos de análise, sendo o mesmo incubado a 30°C com substratos específicos para a determinação da atividade enzimática desejada. Cada repetição foi conduzida em quatro intervalos de incubação diferentes, sendo utilizados intervalos de 30, 60, 90 e 120 min para α -amilase, trealase e tripsina, enquanto que para a sacarase foram utilizados os intervalos de 15, 30, 45 e 60 min. Controles de hidrólise do substrato (sem enzima) e formação de cor a partir do extrato enzimático (sem substrato) foram realizados. O pH ótimo das diferentes enzimas testadas foi determinado em ensaios utilizando-se diferentes tampões em faixas específicas de pH, todos em concentração final de 50 mM, como ácido cítrico- Na_2HPO_4 (4,0 a 7,0), Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (7,0 a 8,0), Tris (hidroximetil) aminometano-HCl (8,0 a 8,9), glicina-NaOH (pH 8,9 a 10,5) e fosfato-NaOH (10,5 a 12,0) (DAWSON et al., 1989). O pH ótimo das enzimas analisadas foi determinado utilizando o extrato enzimático produzido com o intestino de lagartas não-parasitadas, sendo a atividade relativa calculada

considerando-se o maior valor de atividade como 100%. Os ensaios enzimáticos para as enzimas α -amilase, trealase, sacarase e tripsina foram conduzidos utilizando substratos no pH ótimo de cada enzima testada (Tabela 1).

Tabela 3.1 - Enzimas avaliadas, condições dos ensaios e método de detecção da atividade enzimática do intestino de lagartas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas por *C. flavipes*

Enzima	E.C.	Substrato	pH	Determinação
α -amilase	3.2.1.1	amido (0,5%)	10,0	grupos redutores ¹
sacarase	3.2.1.48	sacarose (10 mM)	6,5	grupos redutores ¹
trease	3.2.1.28	trease (10 mM)	6,5	grupos redutores ¹
tripsina	3.4.21.4	BAPNA (0,87 mM) ³	10,5	<i>p</i> -nitroanilina ²

¹segundo Noelting e Bernfeld (1948); ²segundo Erlanger, Cohen e Kokowsky (1961);

³BAPNA: α -N-Benzoyl-D,L-Arginina-*p*-nitroanilida

Uma unidade de atividade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 μ mol de produto/min. A atividade específica das enzimas foi expressa em função da concentração proteica dos extratos, a qual foi determinada de acordo com teste colorimétrico proposto por Bradford (1976), utilizando-se o reagente Coomassie Plustm Protein Assay (Pierce[®]), seguindo as recomendações do fabricante.

As médias das atividades enzimáticas determinadas para os grupos de lagartas parasitadas e não-parasitadas foram comparadas pelo teste *t* ($P < 0,05$), utilizando o programa R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

3.2.4 Efeito do parasitismo por *C. flavipes* no tempo de retenção de alimento no trato alimentar de lagartas de *D. saccharalis*

O tempo de retenção do alimento no tubo digestivo de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas ou não parasitadas por *C. flavipes* foi determinada utilizando-se lagartas selecionadas assim como descrito anteriormente, aos 5 DAP. As lagartas foram selecionadas ao acaso e mantidas em jejum por um período de 16 h. Ao término do período de jejum, as lagartas foram alimentadas com dieta padrão acrescida de 0,1% do corante Calco Oil Red (PARRA; KOGAN, 1981) por 60 min. Após o período de alimentação na dieta acrescida do

corante Calco Oil Red, as lagartas foram novamente transferidas para dieta sem corante pelo período necessário para o aparecimento de fezes sem corante.

Foram realizadas seis repetições para cada tratamento (lagartas P x NP), sendo que cada lagarta constituiu uma repetição. As médias foram comparadas pelo teste t ($P < 0,05$), utilizando o programa R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

3.3 Resultados

3.3.1 Índices nutricionais

O parasitismo de lagartas de último ínstar de *D. saccharalis* por *C. flavipes* influenciou o consumo e utilização do alimento pelo hospedeiro (Tabela 3.2). O consumo de lagartas parasitadas foi substancialmente reduzido se comparado ao de lagartas controle (Tabela 3.2). No entanto, mesmo com a redução no consumo observada em lagartas parasitadas, o peso máximo obtido não diferiu daquele alcançado por lagartas não-parasitadas (Tabela 3.2). Porém, a redução no consumo total de lagartas parasitadas acabou refletindo em alguns índices nutricionais, reduzindo as taxas de consumo relativo (RCR), crescimento relativo (RGR) e de metabolismo relativo (RMR) (Tabela 3.2), enquanto a eficiência de conversão do digerido (ECD) foi substancialmente superior em lagartas parasitadas (Tabela 3.2). Já a eficiência de conversão do ingerido (ECI) e a digestibilidade aproximada (AD), não foram alteradas devido ao parasitismo (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Efeito do parasitismo por *Cotesia flavipes* nos índices nutricionais de lagartas de último ínstar de *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial a base de farelo de soja e germe de trigo ($28 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 10\%$ UR; 14 h de fotofase).

Tratamento	Consumo (g/ind.)	Peso ganho (mg/ind.)	RCR (mg/mg/d)	RMR (mg/mg/d)	RGR (mg/mg/d)	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)
Controle	1,10 $\pm$ 0,05	24,30 $\pm$ 2,20	12,68 $\pm$ 1,81	8,92 $\pm$ 1,32	0,20 $\pm$ 0,006	2,26 $\pm$ 0,22	3,26 $\pm$ 0,33	71,27 $\pm$ 2,20
Parasitada	0,80 $\pm$ 0,06	19,10 $\pm$ 1,20	8,06 $\pm$ 0,76	4,91 $\pm$ 0,58	0,18 $\pm$ 0,003	2,61 $\pm$ 0,26	5,10 $\pm$ 0,92	62,64 $\pm$ 4,74
Valor de p	0,0010*	0,0750	0,0455*	0,0183*	0,0007*	0,3119	0,0403*	0,0767

* representa diferença significativa entre resultados na mesma coluna de acordo com teste de t ($P \leq 0,05$).

3.3.3 pH ótimo e atividade das enzimas do intestino de lagartas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas por *C. flavipes*

As despolimerases α -amilase e tripsina do intestino de *D. saccharalis* apresentaram atividade máxima em condição alcalina, com pH ótimo de 10,0 e 10,5, respectivamente, sendo a atividade enzimática das mesmas sendo reduzida em mais de 50% em pH inferior a 9,0 ou superior a 11,0 (Figura 3.2). Trealase e sacarase, por sua vez, tiveram maior atividade em condição de pH ligeiramente ácida, pH = 6,5 (Figura 3.2). A sacarase se mostrou muito mais sensível do que a trealase para mudanças no pH ao redor da faixa ótima. Enquanto a trealase ainda apresentou 40% de sua atividade em pH = 4,0, a atividade da sacarase neste pH foi nula. Em condições alcalinas, ambas enzimas apresentaram basicamente o mesmo comportamento, com rápido decréscimo na atividade em pH superior a 7,0 (Figura 3.2).

Figura 3.1 - Efeito do pH na atividade relativa (%) de enzimas do trato digestivo de *D. saccharalis*. A) α -amilase; B) sacarase; C) trealase; D) tripsina

O parasitismo de lagartas de *D. saccharalis* por *C. flavipes* influenciou a atividade específica (U/mg de proteína) das diferentes carboidrases avaliadas nesse estudo, dependendo do período de desenvolvimento do inseto (Figuras 3.3A-C). A atividade específica de sacarase e trealase em lagartas de *D. saccharalis* parasitadas foi crescente durante o desenvolvimento do parasitoide, atingindo valores máximos 9 DAP, sendo a atividade das mesmas decrescente 3 DAP em lagartas não-parasitadas (Figuras 3.3B-C). O padrão de atividade específica da α -

amilase em lagartas não-parasitadas foi semelhante àquele observado para a sacarase e trealase, sendo gradualmente decrescente a atividade específica dessa enzima após 3 DAP (Figura 3.3A). No entanto, diferentemente do observado para as demais carboidrases em lagartas parasitadas, a atividade específica da α -amilase atingiu seu máximo aos 7 DAP, apresentando acentuado decréscimo em sua atividade 9 DAP (Figura 3.3A). Nenhuma alteração na atividade específica de tripsina foi observada em lagartas de *D. saccharalis* ao longo do parasitismo (Figura 3.3D).

Figura 3.2 - Efeito do parasitismo por *Cotesia flavipes* na atividade específica (U/mg de proteína) (média $\pm$ erro médio) de enzimas do intestino médio de lagartas de 6º ínstar de *Diatraea saccharalis* em diferentes períodos de desenvolvimento (1, 3, 5, 7 e 9 dias). (♦) Lagartas não-parasitadas e (□) parasitadas por *Cotesia flavipes*. A = α -amilase, B = sacarase, C = trealase, D = tripsina. (*) representa diferença significativa entre valores do mesmo intervalo de desenvolvimento, segundo teste *t* de Student ($P \leq 0,05$).

3.3.4 Fluxo de alimento pelo tubo digestivo de lagartas parasitadas e não-parasitadas

O tempo de trânsito do alimento pelo canal alimentar de lagartas não-parasitadas foi cerca de 3 vezes mais rápido ($154,0 \pm 22,1$ min) do que aquele observado para lagartas parasitadas ($457,0 \pm 83,0$ min) (teste *t*, $P = 0,01292$).

3.4 Discussão

O parasitoide *C. flavipes* induz mudanças significativas no processo de digestão e processamento do alimento consumido por lagartas de *D. saccharalis*, levando a alterações significativas na eficiência de utilização e assimilação de nutrientes pelo hospedeiro.

O parasitismo por *C. flavipes* interferiu na atividade da maioria das enzimas que hidrolisam açúcares no intestino de lagartas de *D. saccharalis*, mas principalmente de sacarase e trealase. As enzimas do trato digestivo de lagartas de *D. saccharalis* investigadas, apresentaram pH ótimo e atividade em uma ampla faixa de pHs, assim como relatado para outras espécies de Lepidoptera (FERREIRA et al., 1994; SANTOS; FERREIRA; TERRA, 1983; TERRA; FERREIRA, 2005), incluindo a sacarase e a tripsina já descritas para esse inseto (CARNEIRO et al., 2004; LOPES et al., 2006). Apesar da inexistência de dados sobre o pH ótimo para a atividade de α -amilase (pH 10,0) e trealase (pH 6,5) para *D. saccharalis*, os valores aqui observados se assemelham àqueles encontrados em determinações feitas para inúmeros outros lepidópteros (TERRA; FERREIRA, 2005).

Todas as enzimas digestivas avaliadas no trato digestivo de lagartas não-parasitadas apresentaram redução crescente nos níveis de atividade à medida que se aproximavam do término da fase larval de desenvolvimento e se preparavam para iniciar a fase de pupa. Isso pode ser explicado pelo fato de que os níveis desse hormônio aumentam substancialmente próximo à fase de muda em insetos (CHAPMAN, 1998) e que os mesmos reduzem a atividade das carboidrases intestinais (SUZUKI et al., 2011). O mesmo efeito dos ecdisteroides não é observado sobre as proteases intestinais (BLAKEMORE; WILLIAMS; LEHANE, 1995; BOROVSKY, 2003).

Como lagartas parasitadas por *D. saccharalis* apresentam alteração em seu desenvolvimento, tendo inibida a sua transformação em pupa, dada à injeção de veneno e fluído do cálice no momento do parasitismo (LOPES, 2008), fica evidente a existência de mecanismos de manipulação hormonal desse hospedeiro. Assim, é possível que lagartas parasitadas tenham seus níveis de ecdisteroides reduzidos para evitar que as mesmas iniciem a fase de muda, assim como relatado para vários outros sistemas hospedeiro-parasitoide (DOVER et al., 1987; PENNACCHIO et al., 1994), resultando na manutenção dos níveis de expressão das carboidrases no trato digestivo do hospedeiro.

Outra possibilidade para explicar a maior atividade enzimática observada para a sacarase e trealase seria a indução da expressão gênica no epitélio digestivo de lagartas pelo parasitoide, de forma semelhante ao que ocorre em outros tecidos ligados ao metabolismo,

como o tecido adiposo (SHELBY; WEBB, 1994, 1997). Ainda há a possibilidade de que a maior atividade enzimática no trato digestivo de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes*, pelo menos em parte, esteja associada ao maior período de retenção do bolo alimentar no trato digestivo do inseto. Lagartas parasitadas reteram o alimento em contato com o trato digestivo por um período de tempo quase 3x superior àquele de lagartas não-parasitadas. Lepidoptera, assim como outros insetos, apresenta mecanismo contra-corrente de digestão, uma adaptação do processo de digestão do alimento voltada à maximização da assimilação dos produtos da digestão e ao reaproveitamento das enzimas digestivas (TERRA; FERREIRA; BAKER, 1996). Dessa forma, seria de se esperar que a retenção do alimento por períodos mais prolongados no trato digestivo reduziria as perdas enzimáticas associadas à movimentação das mesmas junto com o bolo alimentar. Em sendo isso verdadeiro, esperaria-se o aumento na concentração de todas as enzimas, o que resultaria na detecção de maiores atividades nos extratos intestinais de lagartas parasitadas, incluindo as proteases. No entanto, as proteases em lagartas parasitadas apresentaram atividade idêntica àquela de lagartas não-parasitadas. Porém, como proteases são enzimas induzidas, expressas apenas após ingestão do alimento (BOROVSKY, 2003; THOMSEN; MÜLLER, 1963), seria de se esperar atividade enzimática reduzida em lagartas parasitadas em relação às não-parasitadas, dado o consumo de alimento reduzido pelas lagartas parasitadas. Assim, entendemos que os níveis de atividade de protease em lagartas parasitadas puderam ser mantidos, mesmo com a redução na ingestão, em níveis comparáveis àqueles de lagartas não-parasitadas, justamente pela redução na perda dessas enzimas devido ao maior período de retenção do alimento no trato digestivo das mesmas.

O aumento do tempo de permanência do alimento no trato digestivo de lagartas parasitadas provavelmente seja em função da redução da atividade peristáltica na condição de parasitismo, da mesma forma que diagnosticado em lagartas de *M. sexta* parasitadas por *Cotesia congregata* (ADAMO, 2005; COOPER; BECKAGE, 2010).

As alterações encontradas nos níveis de atividade enzimática da sacarase e trealase no trato digestivo de *D. saccharalis*, ao longo do desenvolvimento do parasitoide, acarretam na priorização no processamento dos açúcares, principalmente a sacarose, a qual é abundante no alimento do inseto. A manipulação do metabolismo de açúcares em hospedeiros parece ser um processo comum na estratégia de exploração hospedeira por parasitoides cenobiontes, já que alterações nos níveis de açúcares na hemolinfa e/ou tecido adiposo de hospedeiros são relatadas para várias outras espécies (DAHLMAN; VINSON, 1975; NAKAMATSU et al., 2001; SALVADOR; CÔNSOLI, 2008; THOMPSON, 1982). Em alguns casos, há

comprovada interferência no processo de seleção do alimento, fazendo com que lagartas parasitadas escolham por alimentos com maior razão carboidrato : proteína, com efeitos diretos nos processos de glicogênese e gliconeogênese (THOMPSON, 2001; THOMPSON; DAHLMAN, 1998; THOMPSON; REDAK; BORCHARDT, 2002). Essas alterações podem estar implicadas na simples disponibilização de uma fonte de energia de fácil processamento pelo parasitoide, dada a maior facilidade de digestão e utilização de carboidratos se comparados a outros substratos, ou ainda fazer parte do processo de sinalização da via de insulina, responsável pelo controle do direcionamento dos nutrientes no hospedeiro (ver revisão por WU; BROWN, 2006).

A trealase intestinal pode ser encontrada na forma solúvel no lúmen intestinal ou associada às membranas. Apesar da reconhecida função da trealase em quebrar o principal açúcar circulante na hemolinfa de insetos, a trealose, em glicose, e da indicação que a trealase intestinal esteja envolvida no reaproveitamento da trealose que difunde da hemolinfa para o lumen intestinal via gradiente (WYATT, 1967), acredita-se que a maior atividade dessa enzima no trato digestivo de *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* seja decorrente do seu envolvimento com a redução da atividade de compostos tóxicos presentes no alimento, assim como sugerido pelo aumento da expressão da mesma em resposta à ingestão de compostos tóxicos (SILVA; TERRA; FERREIRA, 2006). O comportamento apresentado pela α -amilase não permite o desenvolvimento de qualquer hipótese, visto que a sua atividade foi extremamente aumentada apenas em um período bem particular do desenvolvimento do parasitoide.

No entanto, o aumento do tempo de permanência do alimento no trato digestivo e da atividade de carboidrases no intestino médio de lagartas parasitadas ao final do parasitismo em relação às lagartas não-parasitadas parecem não influenciar o processamento do alimento ingerido, visto que a digestibilidade aproximada (DA) e a eficiência de conversão do ingerido (ECI) não diferiram entre os tratamentos.

Assim, o parasitismo aumenta a eficiência de conversão do alimento digerido em biomassa em larvas de último instar de *D. saccharalis*, mesmo havendo menores taxas de consumo e crescimento relativo. Esta maior eficiência pode estar relacionada aos mecanismos que levam à redução da taxa metabólica relativa (RMR) em lagartas parasitadas, a qual se refere à quantidade de alimento gasto no metabolismo. Um mecanismo possível seria a regulação dos níveis de peptídeos do tipo insulina no hospedeiro pelo parasitoide. Em insetos, insulina apresenta função distinta daquela de vertebrados. Enquanto em vertebrados a insulina induz o acúmulo de reservas de carboidratos, em insetos os peptídeos do tipo insulina testados

até o momento estimulam o consumo de carboidratos. Ainda, peptídeos do tipo insulina também estão ligados à produção de ecdisteroides (ver revisão por WU; BROWN, 2006). Assim, a regulação dos níveis de insulina evitaria a utilização de carboidratos pelos tecidos do hospedeiro, tornando esses nutrientes disponíveis ao consumo pelos parasitoides em desenvolvimento. Apesar dos níveis de glicose circulante na hemolinfa de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* ser inferior ao de lagartas não-parasitadas (SALVADOR; CÔNSOLI, 2008), sabe-se que esta redução é consequência do hábito gregário de parasitismo (NAKAMATSU et al., 2001) se comparado ao hábito solitário (DAHLMAN; VINSON, 1975; THOMPSON, 1982), possivelmente pelo maior consumo desse nutriente pelas larvas do parasitoide. Com isso, ao regular os níveis de insulina do hospedeiro, parasitoides controlam a disponibilidade de carboidratos e evitam a estimulação da produção de ecdisteroides e a síntese *de novo* de açúcares (THOMPSON et al., 2001, 2002, 2005), demonstrando que o sistema *D. saccharalis* – *C. flavipes* apresenta potencial para investigações detalhadas dos mecanismos moleculares e bioquímicos da aquisição e alocação de nutrientes, em particular da via metabólica da insulina. Ainda, esse sistema se mostra como um excelente candidato para que moléculas originadas do parasitismo sejam isoladas e identificadas para a avaliação do seu potencial biotecnológico para aplicação no manejo de insetos-praga.

3.5 Conclusões

- O parasitismo por *C. flavipes* interfere no consumo e utilização do alimento por lagartas de *D. saccharalis*;
- O parasitismo por *C. flavipes* reduz, de forma significativa, o gasto de energia para a manutenção do metabolismo de lagartas de *D. saccharalis*;
- O parasitismo por *C. flavipes* prolonga o tempo de retenção do alimento no trato digestivo de lagartas de *D. saccharalis*;
- A atividade das carboidrases α -amilase, sacarase e trealase do intestino médio de lagartas de *D. saccharalis* é influenciada pelo parasitismo por *C. flavipes*;

- A atividade de proteinases do intestino médio de lagartas de *D. saccharalis* não é influenciada pelo parasitismo por *C. flavipes*;
- A redução no consumo de lagartas parasitadas é compensada pelo melhor aproveitamento do alimento digerido.

Referências

- ADAMO, S.A. Parasitic suppression of feeding in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: parallels with feeding depression after an immune challenge. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 60, n. 4, p. 185-197, 2005.
- BECKAGE, N.E.; GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development implication for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 299-330, 2004.
- BLAKEMORE, D.; WILLIAMS, S.; LEHANE, M.J. Protein stimulation of trypsin secretion from the opaque zone midgut cells of *Stomoxys calcitrans*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 110B, n. 2, p. 301-307, 1995.
- BOROVSKY, D. Biosynthesis and control of mosquito gut proteases. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 55, n. 8, p. 435-441, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-54, 1976.
- CARNEIRO, C.N.B.; ISEJIMA, E.M.; SAMUELS, R.I.; SILVA, C.P. Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalkborer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, n. 11, p.1093-1101, 2004.
- CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.770 p.
- COOPER, P.D.; BECKAGE, N.E. Effects of starvation and parasitismo on foregut contraction in larval *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, n. 12, p. 1958-1965, 2010.
- DAHLMAN, D.L.; VINSON, S.B. Trehalose level in the hemolymph of *Heliothis virescens* parasitized by *Campoletis sonorensis*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 69, n. 3, p. 523-524, 1976.
- DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. (Ed.). **Data for biochemical research**. NewYork: Oxford University Press, 1989. 580 p.
- DOVER, B.A.; DAVIES, D.H.; STRAND, M.R.; GRAY, R.S.; KEELEY, L.L.; VINSON, S.B. Ecdysteroid-titre reduction and developmental arrest of last-instar *Heliothis virescens* larvae by calyx fluid from the parasitoid *Campoletis sonorensis* **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 333-338, 1987.

ERLANGER, B.F.; COHEN, W.; KOKOWSKY, N. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and physiology**, Oxford, v. 107A, n. 4, p. 631-640, 1994.

HUANG, F.; CAO, T.; SHI, M.; CHEN, Y.; CHEN, X. Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Cotesia vestalis* or *Diadegma semiclausum*. **Insect Science**, Beijing, v. 15, n. 3, p.237-243, 2008.

JONES, D. Biochemical interaction between *Chelonine* wasps and their lepidopteran hosts: after a decade of research - the parasite is in control? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 26, n. 10, p. 981-996, 1996.

LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; MARANA, S.R.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsin and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 130-140, 2006.

NAKAMATSU, Y., GYOTOKU, Y., TANAKA, T. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 573-584, 2001.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimento por insetos. In: PANIZZU, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. p. 9-25.

_____. **Técnicas de criação dos insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137 p.

PARRA, J.R.P.; KOGAN, M. Comparative analysis of methods for measurements of food intake and utilization using the soybean looper and artificial media. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 45-57, 1981.

PARRA, J.R.P.; MIHSFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder: Westview Press, 1992. p. 195-209.

PENNACCHIO, F.M.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 233-258, 2006.

PENNACCHIO, F.; VINSON, S.B.; TREMBLAY, E.; TANAKA, T. Biochemical and developmental alterations of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae induced by the endophagous parasitoid *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 26, n. 2/3, p. 211-213, 1994.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. R Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 25/06/2011.

SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F.L. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, Orlando, v. 45, n. 1, p. 103-110, 2008.

SANTOS, C.D.; FERREIRA, C.; TERRA, W.R. Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 707-714, 1983.

SCHAFELLNER, C.; MARKTL, R.C.; SCHOPF, A. Inhibition of juvenile hormone esterase activity in *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) larvae parasitized by *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera, Braconidae) **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 8, p. 858-868, 2007.

SHELBY, K.S.; WEBB, B.A. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 263-270, 1997.

SHELBY, K.S.; WEBB, B.A. Polydnavirus infection inhibits synthesis of an insect plasma protein, arylphorin. **Journal of General Virology**, London, v. 75, n. 9, p. 2285-2292, 1994.

SCHMIDT, O. At the core of parasitoid-host interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 61, n. 3, p. 107-109, 2006.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Absorption of toxic beta-glycosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 143, n. 3, p. 367-373, 2006.

STRAND, M.R.; PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 31-56, 1995.

SUZUKI, T.; SAKURAI, S.; IWAMI, M. Steroidal regulation of hydrolyzing activity of the dietary carbohydrates in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 1282-1289, 2011.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. San Diego: Elsevier, 2005. v. 4, p. 171-224.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BAKER, J.E. Compartmentalization of digestion. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P.F (eds). **Biology of insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996, chap. 8, p. 206-231.

THOMPSON, S.N. Effects of parasitization by the insect parasite *Hyposoter exiguae* on the growth, development and physiology of its host *Trichoplusia ni*. **Parasitology**, Cambridge, v. 84, n. 2, p. 491-510, 1982.

THOMPSON, S.N. Parasitism enhances the induction of glucogenesis by the insect *Manduca sexta* L. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 33, n. 2, p. 163-173, 2001.

THOMPSON, S.N., DAHLMAN, D.L. Aberrant nutritional regulation of carbohydrate synthesis by parasitized *Manduca sexta* L. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, n. 9, p. 745-753, 1998.

THOMPSON, S.N.; REDAK, R.A.; BORCHARDT, D.B. The glucogenic response of a parasitized insect *Manduca sexta* L. is partially mediated by differential nutrient intake. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1571, n. 2, p. 138-150, 2002.

THOMPSON, S.N.; REDAK, R.A.; WANG, L.W. Altered dietary nutrient intake maintains metabolic homeostasis in parasitized larvae of the insect *Manduca sexta* L. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 204, n. 23, p. 4065-4080, 2001.

THOMPSON, S.N.; REDAK, R.A.; WANG, L.W. Nutrition interacts with parasitism to influence growth and physiology of the insect *Manduca sexta* L. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, n. 4, p. 611-623, 2005.

THOMSEN, E.; MÜLLER, I. Influence of neurosecretory cells and of corpus allatum on intestinal protease activity in the adult *Calliphora erythrocephala* (Meig). **Journal of Experimental biology**, London, v. 40, n. 2, p. 301-321, 1963.

VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.

VINSON, S.B.; PENNACCHIO, F.; CÔNSOLI, F.L. The parasitoid–host interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific, 2001. p. 187-206.

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

WYATT, G.R. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 4, p. 287-360, 1967.

WU, Q.; BROWN, M.R. Signalling and function of insulin-like peptides in insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 1-24, 2006.

4 AVALIAÇÃO DE TRANSCRITOS DO OVÁRIO E GLÂNDULA DE VENENO DE *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) ASSOCIADOS À REGULAÇÃO HOSPEDEIRA

Resumo

Parasitoides cenobiontes se utilizam de inúmeras moléculas para a regulação de diversos processos fisiológicos do hospedeiro para garantir o sucesso do parasitismo e o desenvolvimento do parasitoide imaturo. As moléculas que apresentam função de regulação do hospedeiro, e que estão associadas ao parasitoide, podem ter origem em diferentes tecidos do parasitoide, dependendo da sua história evolutiva e estratégia de utilização do hospedeiro. No entanto, o veneno e as secreções do ovário são fontes comuns de moléculas proteicas com bioatividade em inúmeras espécies de parasitoides, apesar de alguns também contarem com moléculas derivadas de partículas de vírus simbiotes de polidna, de secreções das larvas do parasitoide e de teratócitos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi identificar a presença de moléculas proteicas associadas ao fluido do cálice e ao veneno de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), com potencial de regulação da fisiologia do hospedeiro *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), via análise do transcriptoma da glândula de veneno e do tecido do ovário desse endoparasitoide cenobionte. Os tecidos de interesse foram obtidos via dissecação de pupas fêmeas de *C. flavipes*, submetidos a protocolo padrão de extração de RNA e síntese de biblioteca de cDNA para transformação, seleção e análise de transcritos. A maioria dos transcritos analisados, tanto para a glândula de veneno, quanto para o ovário de *C. flavipes*, resultaram em proteínas de função desconhecida quando comparadas àquelas depositadas nos bancos de dados. No entanto, vários transcritos isolados da glândula de veneno de *C. flavipes* codificam por proteínas putativas de função possivelmente associada à regulação hospedeira, como algumas proteases, um inibidor de proteases e uma proteína com ação antimicrobiana. Das proteínas preditas pela análise dos transcritos selecionados do ovário das fêmeas do parasitoide, pelo menos uma, a proteína do tipo *ep1*, está relacionada ao processo de regulação hospedeira por parasitoides. A função das proteínas codificadas pelos transcritos no processo de regulação hospedeira e a necessidade da caracterização das mesmas são discutidas.

Palavras-chave: Parasitoide; Proteínas reguladoras; Regulação hospedeira

Abstract

Koinobiont parasitoids have an array of molecules available to regulate a number of physiological processes of their hosts to guarantee parasitization and parasitoid immature development. Parasitoid-derived molecules used in host regulation are derived from different parasitoid tissues depending on the parasitoid evolutionary history and on the host utilization strategy. Nevertheless, venom and secretions from the ovaries (calyx fluid) are common sources of proteinaceous molecules with such role on a number of parasitoid species, although some can also count on symbiotic-associated polidna virus particles, parasitoid larval secretions and teratocytes as sources of host regulatory molecules. Therefore, the objective of this work was to identify the presence of proteinaceous molecules associated with the calyx fluid and venom of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) with a potential role in the regulation of the physiology of the host *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), by assessing the transcriptome of the venom gland and ovaries of this parasitoid.

Ovaries and the venom gland were dissected out of female pupae of *C. flavipes* and were subjected to RNA extraction for the synthesis and analysis of cDNA libraries. Most of the sequences obtained from the venom gland and ovaries of *C. flavipes* did not match any known protein in database searches. However, several sequences obtained from the venom gland yielded the identification of proteins with a putative function associated with host regulation, as proteases, protease inhibitors and antimicrobial proteins. In the case of ovaries, at least one sequence resulted in the identification of a putative early expressed protein (*ep1*), analogous to other proteins that are known to participate in the process of host regulation by parasitoids. The role of the putative proteins identified from the venom gland and ovaries of *C. flavipes* in the process of host regulation and the need for further characterization in order to evaluate their biotechnological potential for developing strategies for pest control are discussed.

Keywords: Host regulation; Parasitoid; Regulatory proteins

4.1 Introdução

Parasitoides alteram as condições de desenvolvimento de seus hospedeiros e são munidos de moléculas bioativas que derivam de diferentes órgãos e tecidos para auxiliá-los na regulação hospedeira (VASS; NAPPI, 2000; VINSON; IWANTSCHI, 1980). No momento da oviposição, fêmeas de parasitoides depositam, além dos ovos, moléculas bioativas produzidas pelas glândulas de veneno (ASGARI; RIVERS, 2011; DANNEELS; RIVERS; DE GRAAF, 2010; KAESLIN et al., 2010; MOREAU; GUILLOT, 2005; NAKAMATSU; TANAKA, 2003) e células do cálice do ovário (VINSON, 1972; YU et al., 2007), as quais permitem a colonização do hospedeiro e garantem o desenvolvimento inicial do parasitoide (SUZUKI; MIURA, TANAKA, 2008; SUZUKI; TANAKA, 2007).

Além das moléculas que compõem o fluido do cálice, parasitoides de algumas subfamílias de Braconidae e Ichneumonidae apresentam partículas virais simbiotes (virus de poliDna – PDV) associadas, as quais são injetadas conjuntamente com os ovos do parasitoide, infectando diversos tecidos do hospedeiro, onde passam a expressar genes virais, tornando-se um dos principais recursos responsáveis pela inativação do sistema imunológico do hospedeiro (GLATZ; ASGARI; SCHMIDT, 2004; WEBB; STRAND, 2005). Os componentes do veneno e do fluido do ovário também exercem papel fundamental na regulação do hospedeiro, interferindo, por exemplo, na resposta imunológica humoral (inibição da atividade das fenoloxidasas) (COLINET et al., 2009; KITANO; WAGO; ARAKAWA, 1990; LU; BECK; STRAND, 2010; SHELBY et al., 2000) e celular do hospedeiro (inibição da capacidade de suas células de defesa se aderirem e se espalharem pela superfície do invasor) (MABIALA-MOUNDOUNGOU et al., 2010; NALINI; KIM, 2007; SUZUKI; MIURA; TANAKA, 2008).

Os recursos de origem maternal, com exceção dos PDVs, que produzem moléculas bioativas quando infectando o hospedeiro do parasitoide (WEBB; STRAND, 2005), podem ter atividade efêmera e não serem ativos durante todo o desenvolvimento do parasitoide. Como exemplos, o veneno de *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Braconidae), que perde a capacidade de inibir a agregação *in vitro* de hemócitos de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) após 4 h de incubação (YU et al., 2007), e as proteínas do fluido do cálice de *Campoletis sonorensis* (Cameron) (Hymenoptera Braconidae), que inibem a encapsulação do ovo do parasitoide por seu hospedeiro apenas em um primeiro momento, deixando essa tarefa para proteínas virais que serão secretadas mais tardiamente no desenvolvimento do parasitoide (WEBB; LUCKHART, 1996). Para suprir as necessidades do parasitoide durante o parasitismo, além das proteínas secretadas pelas células infectadas pelos PDVs, outras fontes de moléculas como os teratócitos, células derivadas de tecidos extra-embionários do ovo do parasitoide (DAHLMAN, 1990; FALABELLA et al., 2009; SUZUKI; TANAKA, 2007), e a própria larva em desenvolvimento (FUEHRER; WILLERS, 1986; HOCHULI; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 1999; KAESLIN et al., 2006), também podem auxiliar no processo de regulação hospedeira.

As moléculas responsáveis pela regulação hospedeira, independente se derivadas de fontes maternas ou de fontes ativadas durante o desenvolvimento do parasitoide, apresentam grande potencial para exploração biotecnológica pela indústria farmacêutica ou, em especial, agroquímica, visto que essas moléculas são especializadas em controlar diversos processos fisiológicos do hospedeiro, influenciando parâmetros associados à aptidão biológica do inseto, como aqueles ligados ao seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, entre outros (ASGARI; RIVERS, 2011; BECKAGE; GELMAN, 2004; DANNEELS; RIVERS; DE GRAAF, 2010; MOREAU; GUILLOT, 2005). Assim, para o entendimento das funções e conhecimento da diversidade de moléculas potencialmente bioativas associada aos órgãos maternos envolvidos na regulação hospedeira, foi realizada a avaliação dos transcritos dos ovários e da glândula de veneno de fêmeas de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide larval da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae).

4.2 Material e métodos

4.2.1 Insetos

A criação de *D. saccharalis* foi realizada em dieta artificial a base de milho e germe de trigo (PARRA; MIHSFELDT, 1992), em condições controladas ($28\pm1^{\circ}\text{C}$; $60\pm10\%$ UR; fotofase de 14 h), seguindo o procedimento de criação descrito por Parra (1999). O protocolo de criação de *C. flavipes* foi realizado utilizando lagartas de 3° - 5° ínstar de *D. saccharalis* como hospedeiros. As lagartas foram expostas ao parasitismo e, em seguida, colocadas em recipientes de criação contendo dieta artificial de realimentação e mantidas nas mesmas condições controladas descritas anteriormente, até a formação dos casulos do parasitoide. Assim que se formavam, os casulos do parasitoide eram transferidos para recipientes limpos para emergência de *C. flavipes* (PARRA, 1999). Os adultos de *C. flavipes* foram alimentados com solução aquosa de mel (10%) embebida em algodão.

4.2.2 Obtenção dos ovários e da glândula de veneno de *C. flavipes*

Casulos do parasitoide foram obtidos e as pupas removidas do seu interior para dissecação e obtenção de ovários e glândula de veneno, utilizando-se de pupas do parasitoide nas suas fases inicial e intermediária de desenvolvimento (antes da esclerotização do tegumento). Foram coletados aproximadamente 300 glândulas de veneno e 300 ovários de pupas dissecadas em solução salina (0,8% NaCl) estéril, sob microscópio estereoscópico. Os órgãos obtidos foram imediatamente transferidos para a solução RNA lather (Invitrogen®), mantidos em temperatura ambiente (2 h) para infiltração da solução e armazenados a -20°C até a extração do RNA.

4.2.3 Extração e quantificação de RNA

O RNA total das glândulas de veneno e dos ovários obtidos foi extraído utilizando-se o kit de extração SV Total RNA Isolation System (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA obtido foram verificadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, seguindo as recomendações de Sambrook e Russel (2001).

4.2.4 Construção das bibliotecas de cDNA

A variabilidade dos transcritos presentes nas glândulas de veneno e nos ovários de *C. flavipes* foi acessada por meio da construção de biblioteca de cDNA utilizando o kit Smartertm PCR cDNA synthesis (Clontech[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados aproximadamente 50 ng de RNA total de cada tecido para a reação de transcrição reversa e 10 µL do cDNA de fita simples produzido foi diluído (1:5) e utilizado na reação de síntese do cDNA de fita dupla (1 ciclo de 95°C por 1 min e 23 ciclos de 95°C por 15 s, 65°C por 30 s e 68°C por 3 min), seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.5 Clonagem em vetor pGEM

Os cDNAs de fita dupla gerados pela utilização do kit Smartertm PCR cDNA synthesis (Clontech[®]) foram inseridos de maneira não-direcional no vetor pGEM T-easy Vector System (Promega[®]), seguindo as orientações do fabricante. Os plasmídeos contendo transcritos da glândula de veneno e dos ovários de *C. flavipes* foram utilizados na transformação de células quimicamente competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Após transformação, as células foram cultivadas em meio SOC (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose) por 1 h a 37°C, sob agitação constante (200 rpm), plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) (1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl e 1,6 g de ágar, em 100 mL de água), contendo 100 mg/L de ampicilina e 20 µL de solução de 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranoside (X-gal) a 20 mg/mL, preparada em dimetilformamida (Amresco[®]). As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e os transformantes positivos foram selecionados para análise dos insertos.

4.2.6 Reação de PCR e envio para sequenciamento

A análise dos insertos dos diferentes transformantes positivos foi realizada após transferência do clone selecionado, com auxílio de palito de dente estéril, para tubo plástico contendo 50 µL de água Milli-Q estéril, o qual foi submetido à fervura (100°C) em bloco térmico por 10 min. Após esse período, um volume equivalente de água Milli-Q estéril foi adicionado, a amostra misturada por vortex e 2µL dessa solução empregada em reação de PCR.

As reações de PCR dos clones selecionados foram conduzidas em volume final de 25 µL, contendo tampão de reação 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 mM de cada um dos iniciadores universais T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e M13R (5'CAGGAAACAGCTATGAC3') e 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega®). As amplificações foram conduzidas em termociclador programado a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 2 min (35 ciclos); e 72°C por 10 min (1 ciclo). O produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH = 7,2), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação dos fragmentos foi feita em voltagem constante de 100 V em cuba horizontal de eletroforese (Biorad®), contendo o mesmo tampão que o gel foi preparado. A visualização das bandas foi feita em transluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging systems).

Os amplicons produzidos de PCRs do DNA plasmidial de colônias contendo transcritos da glândula de veneno e dos ovários de *C. flavipes* foram purificados por precipitação com álcool em excesso de sais (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e quantificados em comparação à concentração de marcadores de referência (Low mass DNA marker - Invitrogen®), após resolução via eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL), assim como mencionado anteriormente.

As coleções de etiquetas de sequências expressas (ESTs) produzidas foram enviadas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, da Universidade de São Paulo, CEGH/USP, São Paulo. As reações de sequenciamento foram feitas no sequenciador ABI3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), sendo empregado o reagente BigDye® Terminator v3.1 cycle Sequencing kit (código 4337456), utilizando o iniciador T7.

4.2.7 Análise dos ESTs

Os resultados do sequenciamento foram acessados, analisados e editados no programa FinchTV (disponível em www.geospiza.com/finchtv), sendo as sequências selecionadas identificadas tentativamente via comparação com sequências depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”, utilizando as ferramentas de busca BLASTn e BLASTx (www.ncbi.nlm.nih.gov/) e a ferramenta BLAST2GO (disponível em www.blast2go.org), para anotação funcional das mesmas.

4.3 Resultados

A análise de 72 clones selecionados da biblioteca da glândula de veneno de *C. flavipes* produziu alta redundância, permitindo a identificação de 41 sequências proteicas, sendo a maioria delas de função desconhecida (Figura 4.1). Das sequências em que alguma função pode ser predita, a maioria foi identificada como tendo função de protease ou de pertencer ao metabolismo celular (Figura 4.1; Tabela 4.1).

Figura 4.1 - Função putativa para os ESTs da glândula de veneno de *Cotesia flavipes*. Números indicam a quantidade de sequências em cada categoria

Das sequências putativas obtidas, as mais interessantes do ponto de vista de regulação hospedeira são as proteínas com atividade proteolítica, como as proteases aminopeptidase n e a enzima do tipo serina carboxipeptidase induzida por retinoide, e as proteínas envolvidas na inibição de proteases e com atividade antimicrobiana (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Identificação, tamanho, valor de referência e função putativa dos ESTs da glândula de veneno de *C. flavipes* pela ferramenta Blast2Go

Clone	Identificação	Tamanho (pb)	Evalue	Acesso NCBI	Função putativa
<i>Cfvg4</i>	aminopeptidase n	704	$9,0e^{-42}$	EFN65597.1	protease
<i>Cfvg5</i>	proteína “polycomb” (sfmbt)	671	$3,0e^{-45}$	XP_003487218.1	metabolismo celular reguladora da transcrição
<i>Cfvg8</i>	proteína do tipo serina carboxipeptidase induzida por retinoide	676	$3,0e^{-12}$	XP_001605442.1	protease
<i>Cfvg19</i>	proteína s17 do ribossomo 40s	432	$2,0e^{-58}$	AAX62482.1	proteína ribossomal
<i>Cfvg9a</i>	NADH deidrogenase	541	$8,0e^{-22}$	EGI64464.1	metabolismo celular
<i>Cfvg23a</i>	proteína de resposta de defesa	359	$1,8e^{-06}$	ADD20600.1	atividade antimicrobiana; carboxipeptidase
<i>Cfvg32a</i>	proteína do tipo acil-desaturase 1	270	$1,59e^{-15}$	XP_001599579.1	metabolismo celular; metabolismo de lipídeo
<i>Cfvg34a</i>	proteína do veneno	495	$1,02e^{-4}$	Q8WQK0.2	inibição de protease
<i>Cfvg78a</i>	quinase	291	$1,77e^{-20}$	ADD19669.1	desenvolvimento embrionário
<i>Cfvg80a</i>	proteínas ribossomal l37	429	$4,04e^{-46}$	EGI64662.1	proteína ribossomal
<i>Cfvg89a</i>	aminopeptidase n	731	$1,00e^{-5}$	ADK11712.1	protease
<i>Cfvg97a</i>	Tolkin	654	$4,26e^{-50}$	XP_393866.3	protease

Análises de alguns ESTs que não renderam sequências proteicas similares a proteínas de função conhecida nas análises com a ferramenta BLASTx de busca nos bancos de dados, quando analisados com a ferramenta BLASTn, permitiram o reconhecimento de sequências relacionadas a vírus de poliDNA (PDVs) associados a outros parasitoides do gênero, como os clones *Cfvg18* (279 pb) e *Cfvg50v* (381 pb), os quais apresentaram alta similaridade às sequências do bracovírus associado às populações de Mombasa (número de acesso EF710640.1; $Evalue = 3e^{-4}$) e de Kitale (EF710626.1; $Evalue = 4e^{-21}$), respectivamente.

Já a análise da biblioteca de transcritos dos ovários *C. flavipes* contou com o sequenciamento de 64 clones, os quais apresentaram alta taxa de redundância. Das sequências obtidas, 31 não apresentaram qualquer semelhante nos bancos de dados, sendo as demais ligadas ao desenvolvimento, metabolismo celular e imunossupressão (Figura 4.2). Dentre as

ESTs identificadas, destaca-se a proteína *ep1*, ligada à inibição de hemócitos de lagartas de *Plutella xylostella* parasitada por *Cotesia plutellae* (KWON; KIM, 2008) (Tabela 4.3).

Figura 4.2 - Função predita dos ESTs avaliados de ovários de *Cotesia flavipes*. Números indicam a quantidade de sequências em cada categoria

Tabela 4.2 - Identificação, tamanho, valor de referência, proteína predita e função predita para os ESTs do ovário de *C. flavipes* via ferramenta de análise Blast2Go

Clone	Identificação	Tamanho (pb)	Evalue	Acesso NCBI	Função
<i>Cfov4</i>	fator de iniciação da tradução 2	196	$2,57e^{-12}$	EFN69222.1	reguladora da tradução
<i>Cfov5</i>	proteína maternal Tudor	136	$1,59e^{-10}$	XP_003492516.1	oogênese
<i>Cfov13</i>	14-3-3 zeta	169	$4,13e^{-24}$	ABQ95505.1	desenvolvimento embrionário-larval
<i>Cfov18</i>	proteína do tipo <i>ep1</i>	348	$1,18e^{-7}$	AEE09505.1	imunossupressão do hospedeiro
<i>Cfov18a</i>	proteína do tipo “checkpoint” (<i>chk1</i>)	150	$1,97e^{-21}$	ABK29471.1	função desconhecida
<i>Cfov57a</i>	proteína “zinc finger” 180	192	$1,00e^{-12}$	XP_003151187.1	reguladora da transcrição

Assim como encontrado para a glândula de veneno, alguns ESTs que não traduziam por proteínas com similares nos bancos de dados, quando analisados pela ferramenta Blastn resultaram na identificação de sequências similares àsquelas de PDVs associados aos parasitoides *Cotesia sesamiae* (Cameron) e *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) (Tabela 4.4).

Tabela 4.3 - Identificação, tamanho, organismo de referência, número de acesso do e valor de similaridade para ESTs do ovário de *C. flavipes* similares a sequências nucleotídicas de PDVs associados a diferentes espécies de *Cotesia*

Clone	Tamanho (pb)	Organismo	Acesso NCBI	E-value
<i>Cfov7</i>	471	<i>Cotesia sesamiae</i> Mombasa bracovirus	EF710637.1	0.0
<i>Cfov11</i>	181	<i>Cotesia sesamiae</i> Kitale bracovirus	EF710626.1	1e-80
<i>Cfov18</i>	348	<i>Cotesia vestalis</i> bracovirus	HQ009535.1	3e-67
<i>Cfov15</i>	707	<i>Cotesia sesamiae</i> Kitale bracovirus	EF710633.1	0.0
<i>Cfov72</i>	460	<i>Cotesia sesamiae</i> Mombasa bracovirus	EF710641.1	7e-103

4.4 Discussão

O envolvimento de moléculas produzidas pelas glândulas de veneno de parasitoides no processo de regulação hospedeira é reconhecido por diversos autores (ver revisão por MOREAU; GUILLOT, 2005), sendo várias as proteínas caracterizadas com importantes funções no processo de regulação hospedeira, como a γ -glutamil transferase presente no veneno de *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae), envolvida na indução da apoptose de células do ovário de seu hospedeiro (FALABELLA et al., 2007), e a proteína do tipo calreticulina de *Cotesia rubecula* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae), que inibe a capacidade de emissão de filopódios em hemócitos de *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae), implicando na redução da capacidade de encapsulação de corpos estranhos pelo hospedeiro (ZHANG; SCHMIDT; ASGARI, 2006).

Nas glândulas de veneno de *C. flavipes* foram encontradas algumas ESTs que codificam para proteínas com função putativa de proteases. Em um primeiro momento, a presença de proteases no veneno de um parasitóide parece controversa, visto que o sistema de defesa do hospedeiro requer proteases para ativar fenoloxidasas envolvidas na melanização e formação de compostos fenólicos tóxicos (KNOST; GORMAN, 2008). Porém, apesar de proteases terem sido identificadas como componentes do veneno de parasitoides, a atividade hidrolítica do veneno é raramente conhecida, assim como demonstrado para os venenos de *Pimpla hypochondriaca* Retzius (Hymenoptera: Ichneumonidae) (PARKINSON; CONYERS; SMITH, 2002; PARKINSON et al., 2002) e de *Cotesia rubecula* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae) (ASGARI et al., 2003). A detecção de atividade hidrolítica está muito associada ao tipo de substrato testado, visto ter sido identificada atividade de tripsina (Phe–Ser–Arg-AMC), de aminopeptidase (Leu-AMC e L-Arg-AMC) e de dipeptidase (Hip–His–Leu) para o

veneno de *P. hypochondriaca*, sendo ainda demonstrado o alto grau de especificidade das proteases do veneno de parasitoides por substratos (DANI et al., 2003). A ação das proteases presentes no veneno de *C. flavipes* sobre diferentes substratos se faz necessária para se entender a capacidade de hidrólise proteica desse veneno e, conseqüentemente, identificar as proteínas-alvo e a função dessas proteases no processo de regulação hospedeira.

Um EST com a função predita de inibidor de proteases foi encontrada na glândula de veneno de *C. flavipes*. Tem sido demonstrado que inibidores de proteases de veneno, como aquele codificado por esse transcrito, podem inibir as proteases ativadoras do sistema imunológico do hospedeiro (COLINET et al., 2009) ou do próprio reservatório de veneno do parasitoide, mantendo a integridade dos componentes proteicos do veneno (PARKINSON et al., 2004). A caracterização do local de ação e das enzimas-alvo desse inibidor é de grande importância para o entendimento de sua função na regulação hospedeira ou na manutenção da integridade proteica do veneno.

Ao inativar o sistema de defesa do hospedeiro, o parasitoide poderia transformar o hospedeiro em um alvo ideal para infecção por microrganismos patogênicos que, além de competirem por recursos nutricionais, poderiam infectar e inviabilizar o desenvolvimento do parasitoide. Assim, para garantir a assepsia do meio em que vivem (hemocela), parasitoides inoculam substâncias com atividade antimicrobiana, ao mesmo tempo em que suprimem a capacidade de defesa de seu hospedeiro, evitando os efeitos negativos da competição com microrganismos. Substâncias com ação antimicrobiana foram encontradas no veneno de *P. hypochondriaca* (DANI et al., 2003), assim como encontrado na análise das ESTs da glândula de veneno de *C. flavipes*, que apresentou EST homóloga a proteína com atividade antimicrobiana.

Dois ESTs da glândula de veneno de *C. flavipes* apresentaram homologia com sequências de genomas virais depositados no Genbank. Ambos transcritos não apresentaram homologia com nenhuma proteína caracterizada até o momento, mas o fato de transcritos de origem viral estar presente na glândula de veneno mostra que há uma relação evolutiva entre o veneno de *C. flavipes* e seus simbiossiontes, os vírus de polidna, assim como proposto por Tanaka (1987) e demonstrado por Webb e Summers (1990).

A diversidade de ESTs encontrada nos ovários de *C. flavipes* foi inferior àquela da glândula de veneno de *C. flavipes*, mas foi possível a identificação de EST homólogo a proteína do tipo *ep1*, a qual tem sido atribuída à função de inibição do sistema imunológico do hospedeiro (KWON; KIM, 2008). As demais ESTs identificadas no ovário de *C. flavipes* estão associadas a processos metabólicos de manutenção da atividade celular (proteínas

ribossomais e reguladoras da transcrição/tradução) ou relacionadas com o tecido de origem (oogênese e desenvolvimento embrionário). Nos ovários de *C. flavipes* também foram encontrados transcritos com homologia a sequências de genomas virais depositados no GenBank, indicando que, assim como esperado (FLEMING; KRELL, 1993), há transcrição de genes do PDV simbiote de *C. flavipes* de função ainda não definida nos ovários desse parasitoide.

No presente trabalho, a maior parte das proteínas analisadas não apresentou similaridade com proteínas depositadas no banco de dados do Genbank, indicando que as proteínas que compõem o veneno e a secreção do ovário de *C. flavipes* sejam específicas dessa espécie ou de características ainda não descritas em outros organismos. A caracterização das proteínas codificadas pelos transcritos analisados, em especial, as proteases, o inibidor de proteases, a proteína com atividade antimicrobiana e a proteína imunossupressora presentes nas glândulas de veneno e ovários de *C. flavipes* é muito importante para que informações a respeito de sua função no processo de parasitismo sejam estabelecidas.

4.5 Conclusões

- A glândula de veneno e os ovários de *C. flavipes* produzem moléculas bioativas com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de insetos-praga;
- A glândula de veneno de *C. flavipes* produz proteínas com ação proteolítica, de regulação do desenvolvimento e de atividade antimicrobiana;
- O ovário de *C. flavipes* expressa proteína voltada à inibição do sistema imunológico do hospedeiro, como a “proteína de expressão precoce” *ep1*;
- Genes virais integrados ao genoma do parasitoide também são expressos na glândula de veneno e no ovário de *C. flavipes*.

Referências

- ASGARI, S.; RIVERS, D.B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 56, p. 313-335, 2011.
- ASGARI, S.; ZHANG, G.; ZAREIE, R.; SCHMIDT, O. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 1017-1024, 2003.
- BECKAGE, N.E., GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.49, p.299-330, 2004.
- COLINET, D.; DUBUFFET, A.; CAZES, D.; MOREAU, S.; DREZEN, J.; POIRIE, M. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 33, n. 6, p. 681-689, 2009.
- DANI, M.P.; RICHARDS, E.H.; ISAAC, R.E.; EDWARDS, J.P. Antibacterial and proteolytic activity in venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 10, p. 945-954, 2003.
- DANNEELS, E.L.; RIVERS, D.B.; DE GRAAF, D.C. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: Recent discovery of an untapped pharmacopee. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 494-516, 2010.
- DAHLMAN, D.L. Evaluation of teratocyte functions: an overview. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3-4, p. 159-166, 1990.
- FALABELLA, P.; RIVIELLO, L.; DE STRADIS, M.L.; STIGLIANO, C.; VARRICCHIO, P.; GRIMALDI, A.; EGUILEOR, M.; GRAZIANI, F.; GIGLIOTTI, S.; PENNACCHIO, F. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 11, p. 801-813, 2009.
- FALABELLA, P.; RIVIELLO, L.; CACCIALUPI, P.; ROSSODIVITA, T.; VALENTE M. T.; DE STRADIS, M.L.; TRANFAGLIA, A.; VARRICCHIO, P.; GIGLIOTTI, S.; GRAZIANI, F.; MALVA, C.; PENNACCHIO, F. A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 453-65, 2007.
- FLEMING, J.G.W.; KRELL, P.J. Polydnavirus genome organization. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. chap. 4, p. 189-225.
- FUEHRER, E.; WILLERS, D. The anal secretion of the endoparasitic larva *Pimpla turionellae*: sites of production and effects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 361-367, 1986.

GLATZ, R.V.; ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 12, p. 545-554, 2004.

HOCHULI, A.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Analysis of endoparasitoid-released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae) *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 823-833, 1999.

KAESLIN, M.; REINHARD, M.; BÜHLER, D.; ROTH, T.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* is a complex mixture and has multiple biological effects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 696-694, 2010.

KNOST, M.R.; GORMAN, M.J. Phenoloxidasen in insect immunity. In: BECKAGE, N.E. (Ed.). **Insect immunology**. Amsterdam: Academic Press, 2008. chap. 4, p. 69-96.

KITANO, H.; WAGO, H.; ARAKAWA, T. Possible role of teratocytes of the gregarious parasitoid, *Cotesia* (= *Apanteles*) *glomerata* in the suppression of phenoloxidase activity in the larval host, *Pieris rapae crucivora*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3/4, p. 177-185, 1990.

KWON, B.; KIM, Y. Transient expression of an EP1-like gene encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses the hemocyte population in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Developmental and comparative immunology**, New York, v. 32, n. 8, p. 932-942, 2008.

LU, Z.; BECK, M.H.; STRAND, M.R. Egfl.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 497-505, 2010.

MABIALA-MOUNDOUNGOU, A.D.N.; DOURY, G.; ESLIN, P.; CHERQUI, A.; PRÉVOST, G. Deadly venom of *Asobara japonica* parasitoid needs ovarian antidote to regulate host physiology. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 35-41, 2010.

MOREAU, S.J.M.; GUILLOT, S. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1209-1223, 2005.

NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 149-159, 2003.

NALINI, M.; KIM, Y. A putative protein translation inhibitory factor encoded by *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses host hemocyte-spreading behavior. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 12, p. 1283-1292, 2007.

PARKINSON, N.; RICHARDS, E.H.; CONYERS, C.; SMITH, I.; EDWARDS, J.P. Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 729-735, 2002.

PARKINSON, N.M.; CONYERS, C.; KEEN, J.; MACNICOLL, A.; SMITH, I.; AUDSLEY, N.; WEAVER, R. Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 565-571, 2004

PARKINSON, N.; CONYERS, C.; SMITH, I. A venom protein from the endoparasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* is similar to snake venom reprotolysin-type metalloproteases. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 79, n. 2, p. 129-131, 2002.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação dos insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137 p.

PARRA, J.R.P.; MIHSFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder: Westview Press, 1992. p. 195-209.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.

SHELBY, K.S.; ADEYEYE, O.A.; OKOT-KOTBER, B.M.; WEBB, B.A. Parasitism-linked block of host plasma melanization. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 75, n. 3, p. 218-225, 2000.

SUZUKI, M.; TANAKA, T. Development of *Meteorus pulchricornis* and regulation of its noctuid host, *Pseudaletia separata*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 10, p. 1072-1078, 2007.

SUZUKI, M.; MIURA, K.; TANAKA, T. The virus-like particles of a braconid endoparasitoid wasp, *Meteorus pulchricornis*, inhibit hemocyte spreading in its noctuid host, *Pseudaletia separata*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 1015-1022, 2008.

TANAKA, T. Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanteles kariyai* Watanabe, on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 413-420, 1987.

VASS, E.; NAPPI, A.J. Developmental and immunological aspects of *Drosophila*-parasitoid relationships. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 6, p. 1259-1270, 2000.

VINSON, S.B. Effect of the parasitoid, *Campoletis sonorensis*, on the growth of its host *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1509-1514, 1972.

VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.

WEBB, B.A.; LUCKHART, S. Factors mediating short and long-term immune suppression in a parasitized insect. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 33-40, 1996.

WEBB, B.A.; STRAND, M.R. The biology and genomics of polydnviruses. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. San Diego: Elsevier, 2005. chap. 5, p. 323-360.

WEBB, B.A.; SUMMERS, M.D. Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, n. 13, p. 4961-4965, 1990.

YU, R-x.; CHEN, Y-f.; CHEN, X-x.; HUANG, F.; LOU, Y-g.; LIU, S-s. Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 22-29, 2007.

ZHANG, G.; SCHMIDT, O.; ASGARI, S. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 30, n. 9, p. 756-764, 2006.

5 CARACTERIZAÇÃO DO cDNA E DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE DOIS FATORES LIGADOS À REGULAÇÃO DE *Diatraea saccharalis* (F.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) POR *Cotesia flavipes* (Cameron) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Resumo

Endoparasitoides cenobiontes necessitam contornar os efeitos do sistema imunológico e alterar as condições fisiológicas de seus hospedeiros para criar um ambiente adequado ao seu desenvolvimento. No processo de regulação do sistema imunológico e metabolismo do hospedeiro, várias moléculas com função reguladora são utilizadas. Essas moléculas podem ser produzidas em tecidos maternos e injetadas no hospedeiro no momento da oviposição ou, ainda, produzidas por simbioses associados ao parasitoide (polidnavirus) ou por células derivadas (teratócitos) já no interior do corpo hospedeiro, como acontece com espécies de algumas subfamílias de Braconidae e Ichneumonidae. *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide larval de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), apresenta as partículas virais simbioses e os teratócitos como fontes de moléculas reguladoras de processos fisiológicos do hospedeiro. Neste trabalho, dois novos transcritos foram identificados a partir da análise de biblioteca de cDNA dos teratócitos de *C. flavipes*. Um dos transcritos possui uma fase aberta de leitura de 1.237 pb que codifica para uma serpina (Cfserpina) com cadeia de 411 aminoácidos, peso molecular estimado de 45,93 kDa e ponto isoelétrico pI = 5,58. O outro transcrito, provavelmente de origem viral (PDV), possui uma fase aberta de leitura de 477 pb que codifica para um fator inibidor da tradução do hospedeiro (CfHTIF) (HTIF – “host translation inhibitory fator”) com cadeia de 158 aminoácidos, peso molecular estimado de 17,47 kDa e ponto isoelétrico pI = 9,07. Análises do padrão de transcrição ao longo do desenvolvimento do hospedeiro revelaram que a expressão só é iniciada após o final do período embrionário dos parasitoides, quando ocorre a liberação dos teratócitos na hemocele. A atividade de transcrição de ambos os genes iniciou-se apenas no quinto dia após o parasitismo e foi mantida nos teratócitos até o término da fase interna do desenvolvimento larval do parasitoide (nono dia após o parasitismo). A expressão de um gene ligado ao vírus de poliDNA simbiote de *C. flavipes*, CfHTIF, em teratócitos desse parasitoide, demonstra, pela primeira vez, que essas células também servem de fábrica para a produção de moléculas de origem viral utilizadas na regulação do hospedeiro. As prováveis funções das proteínas Cfserpina e CfHTIF na regulação do hospedeiro *D. saccharalis* por *C. flavipes* são discutidas.

Palavras-chave: Fator de inibição da tradução em eucariotos; Proteína viral; Regulação hospedeira; Serpina; Teratócitos

Abstract

Koinobiont endoparasitoids must circumvent their host's immune system and change their host's chemical composition in a way to create a suitable environment to assure host colonization and immature successful development. In the process of regulation of the host immune system and host metabolism, several regulatory molecules are used. These molecules may originate from maternal tissues and be injected with eggs during parasitization, or be produced by host-derived cell types (teratocytes) within the host hemocel or by symbionts associated with the female parasitoid (polidnavirus), as observed with a few subfamilies of

Braconidae and Ichneumonidae. *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), is associated with symbiotic viral particles and teratocytes, which are sources of bioactive molecules used in host regulation. In here, two new cDNAs isolated from the analysis of a cDNA library of teratocytes of *C. flavipes* are described. One of such cDNAs has a 1,237 bp open reading frame coding for 411 amino acids, with an estimated molecular weight of 45.93 kDa and an isoelectric point of pI = 5.58, putatively identified as a serpin (Cfserpin). The second cDNA has an 477 bp long open reading frame coding for 158 amino acids, with an estimated molecular weight of 17.47 kDa and isoelectric point of pI = 9.07, putatively identified as an eukaryotic translation inhibitory factor (CfHTIF), homologous to host translation inhibitory factors (HTIF) described from polydnavirus associated with other species of *Cotesia*. Transcription of both cDNAs was detected in teratocytes from day 5 to day 9 after parasitization. No transcription of Cfserpin was detected in hemocytes of parasitized hosts. However, small transcription levels of the CfHTIF was detected in hemocytes of parasitized larvae after day 5 of parasitization, although transcription was undetected in other host tissues (visceral and peripheral fat bodies and midgut), reinforcing the possible viral origin of the CfHTIF. The expression of a viral gene in teratocytes of *C. flavipes* is the first indication of the use of these cells as a biofactory for proteins encoded by the polydnavirus associated with insect parasitoids. The putative role of the serpin and the translation inhibitory factor produced by teratocytes of *C. flavipes* in the process of *D. saccharalis* regulation is discussed.

Keywords: Eukaryote translation inhibitory factor; Host regulation; Serpin; Teratocytes

5.1 Introdução

O sistema imunológico de insetos atua contra as adversidades às quais esses organismos são expostos por meio da formação de nódulos, encapsulação e melanização de corpos estranhos, e síntese de compostos com ação antimicrobiana (GONZÁLEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2011; STRAND, 2008). Para evitar as ações impostas pelo sistema imunológico de seus hospedeiros, os endoparasitoides, insetos que se desenvolvem no interior de outros insetos, precisam regular a capacidade de resposta imunológica de seus hospedeiros, como a atividade da fenoloxidase (resposta imunológica humoral) e a capacidade de encapsulação (resposta imunológica celular) (CARTON; POIRIÉ; NAPP, 2008; STRAND; PECH, 1995). Além de inibir as reações do sistema imunológico, os parasitoides alteram outras condições fisiológicas de seus hospedeiros, como, por exemplo, o balanço hormonal e o metabolismo (PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 2009; SALVADOR; CÔNSOLI, 2008; VASS; NAPPI, 2000; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001).

Secreções de tecidos de origem materna, como o veneno (ASGARI; RIVERS, 2011; DANNEELS; RIVERS; DE GRAAF, 2010; KAESLIN et al., 2010; MOREAU; GUILLOT, 2005; NAKAMATSU; TANAKA, 2003) e os fluídos do cálice (VINSON, 1972; YU et al.,

2007), e as moléculas bioativas produzidas por tecidos de origem embrionária, como os teratócitos (BELL et al., 2004; CÔNSOLI et al., 2007; DAHLMAN, 1990; DAHLMAN et al., 2003; QIN; GONG; DING, 2000) e a própria larva em desenvolvimento (FUEHRER; WILLERS, 1986; HOCHULI; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 1999), auxiliam na regulação do hospedeiro pelo parasitoide. Além desses recursos, as associações de simbiose de parasitoides com vírus de poliDNA e com partículas do tipo vírus são fundamentais no processo de regulação hospedeira, principalmente no que se refere à supressão do sistema imunológico do hospedeiro (GLATZ; ASGARI; SCHMIDT, 2004; WEBB; STRAND, 2005).

Os teratócitos, células derivadas da dissociação da membrana da serosa após a eclosão das larvas, são encontrados em representantes de Braconidae, Scelionidae e Platygastriidae (DAHLMAN, 1990; DAHLMAN; VINSON, 1993), apesar de células parecidas a teratócitos terem sido relatadas em Ichneumonidae (ROULEX-BONNIN et al., 1999). Essas células podem apresentar diferentes funções dependendo da interação hospedeiro-parasitoide investigada, produzindo moléculas voltadas à regulação do desenvolvimento (JOINER; VINSON; BENSKIN, 1973; RANA; DAHLMAN; WEBB, 2002; SCHEPERS; DAHLMAN; ZHANG, 1998), à resposta imunológica do hospedeiro (FALABELLA et al., 2009), à utilização do hospedeiro (CACCIA et al., 2011; CÔNSOLI et al., 2007; GOPALAPILLAI; KADONO-OKUDA; OKUDA, 2005; NAKAMATSU; FUJI; TANAKA, 2002), à nutrição do parasitoide via síntese e armazenamento de proteínas (FALABELLA; TREMBLAY; PENNACCHIO, 2000; KADONO-OKUDA; WEYDA; OKUDA, 1998) e ao controle de microrganismos (FUHRER; ELSUFTY, 1979).

No presente trabalho é relatada a caracterização completa de dois transcritos associados aos teratócitos de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide larval de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), assim como o padrão de transcrição dos mesmos ao longo do desenvolvimento do parasitoide. Dos transcritos caracterizados, um codifica para um inibidor de proteinases putativo (*Cf*serpina), enquanto o outro apresenta função putativa de regulação do processo de tradução no hospedeiro (*Cf*HTIF). Análises comparativas da sequência do cDNA do *Cf*HTIF também revelaram que se trata de um transcrito de origem viral, semelhante a fatores de regulação da tradução do hospedeiro produzidos por vírus de poliDNA simbiotes de outras espécies de *Cotesia*. Dessa forma, a detecção de transcritos *Cf*HTIF em teratócitos de *C. flavipes* é o primeiro registro de transcrição de genes de origem viral em teratócitos, indicando que esse tipo celular também pode funcionar como fábrica para a produção de moléculas de origem

viral voltadas à regulação hospedeira. As possíveis funções de ambas proteínas putativas no processo de regulação do hospedeiro *D. saccharalis* por *C. flavipes* são discutidas.

5.2 Material e métodos

5.2.1. Insetos

A criação de *D. saccharalis* foi realizada em dieta artificial a base de milho e germe de trigo (PARRA; MIHSFELDT, 1992), em condições controladas ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 14 h), seguindo o procedimento de criação descrito por Parra (1999).

A criação do parasitoide *C. flavipes* foi realizada oferecendo lagartas de *D. saccharalis* do terceiro ao quinto ínstar para o parasitismo. Uma vez parasitadas, as lagartas foram mantidas nas mesmas condições controladas descritas anteriormente até a formação dos casulos do parasitoide. Depois de formados, os casulos foram transferidos para recipientes limpos para emergência e acasalamento. Os adultos de *C. flavipes* foram alimentados com solução aquosa de mel (10%) embebida em algodão.

5.2.2 Obtenção de teratócitos de *C. flavipes* para construção de biblioteca de cDNA

Lagartas de *D. saccharalis* na fase de premuda para o último ínstar foram expostas individualmente ao parasitismo por *C. flavipes* (apenas uma oviposição/lagarta) e mantidas nas condições de criação descritas anteriormente. Foram mantidas no experimento apenas as lagartas que completaram a troca do tegumento 12 h após a oviposição. Lagartas foram selecionadas aos 5, 7 e 9 dias após o parasitismo para a coleta de teratócitos. As lagartas foram submetidas à esterilização superficial em 70% etanol (5 min), seguida por dois banhos sucessivos em água estéril (5 min/cada). Posteriormente, a hemolinfa das lagartas foi coletada após incisão em uma das falsas-pernas, sendo a hemolinfa extravasada, contendo hemócitos e teratócitos, imediatamente coletada em solução anticoagulante a 4°C (98 mM NaOH, 150 mM NaCl, 1,7 mM EDTA, 46 mM ácido cítrico, pH=4,5) (MASASHI et al., 2001), na proporção de 1 parte de hemolinfa para cada 3 partes de tampão. A amostra foi imediatamente misturada após leve agitação do tubo e submetida ao processo de separação inicial via membrana (CÔNSOLI et al., 2007). Após eliminação do filtrado, as células retidas na superfície da membrana do filtro foram ressuspensas em tampão anticoagulante refrigerado e pequenos volumes dessa suspensão foram transferidos, na forma de gotas, para a superfície de placas de

vidro para inspeção visual e coleta de teratócitos. Após aplicação manual de leve vórtex, os teratócitos foram separados dos hemócitos, dada a concentração dos teratócitos na região central da placa. Os teratócitos foram coletados com auxílio de pipeta Pasteur e ressubmetidos ao mesmo processo de separação de 3 a 5 vezes, até que uma suspensão de teratócitos livres de hemócitos fosse obtida.

5.2.3 Construção e análise da biblioteca de cDNA de teratócitos de *C. flavipes*

O RNA total dos teratócitos foi extraído utilizando-se o kit de extração SV Total RNA Isolation System (PROMEGA[®]), seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA obtido foram verificadas via espectrofotometria, seguindo procedimentos padrões (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O RNA de teratócitos de *C. flavipes* foi submetido ao processo de transcrição reversa e síntese de cDNA de fita dupla para construção de uma biblioteca de cDNA utilizando o kit Smarter[™] PCR cDNA Synthesis (Clontech[®]), utilizando-se aproximadamente 50 ng de RNA total dos teratócitos de *C. flavipes*, sendo 10 µL do cDNA de fita simples diluído 5x utilizado na reação de síntese do cDNA de fita dupla (1 ciclo a 95°C por 1min, seguido por 23 ciclos a 95°C por 15 s, 65°C por 30 s e 68°C por 3 min). O conjunto de cDNA de fita dupla gerado foi clonado de maneira não direcional no vetor pGEM T-Easy vector (Promega[®]), seguindo as orientações do fabricante. Os plasmídeos contendo as informações transcritas pelos teratócitos foram inseridos em células quimicamente competentes de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen[®]) por meio de choque térmico, seguindo as recomendações do fabricante. As células transformadas foram cultivadas em 1 mL de meio SOC a 37°C por 1 h, sob agitação constante (200 rpm), e diferentes alíquotas foram plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani, 1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl e 1,6 g de ágar, em 100 mL de água), contendo 100 mg/L de ampicilina e 20 µL de solução de 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranoside (X-gal) a 20 mg/mL (Amresco[®]) em dimetilformamida, espalhados sobre o meio sólido. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e os transformantes positivos foram selecionadas para análise e caracterização dos insertos.

Os transformantes selecionados foram sujeitos ao método de rápida extração de DNA plasmidial via aquecimento de pequena quantidade de células em 50 µL de água Milli-Q a 100°C por 10 min. Após a exposição das células a fervura, 50 µL de água Milli-Q foram

adicionados a amostra e 2 µL dessa suspensão foi empregada na reação de PCR para amplificação dos insertos.

As reações de amplificação dos insertos foram conduzidas em volume final de 25 µL, contendo 2 µL de solução de DNA plasmidial, tampão da reação 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador universal T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e M13R (5'CAGGAAACAGCTATGAC3'), e 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega®). As reações foram conduzidas em termociclador programado a 94°C por 2 min (1x); 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 2 min (35x); e 72°C por 10 min (1x).

Os amplicons obtidos foram separados via eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), sob voltagem constante (100 V), em cuba horizontal de eletroforese (Biorad®) contendo o mesmo tampão de preparação do gel. A visualização dos produtos de amplificação foi feita em transiluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging systems).

Parte dos amplicons produzidos foi selecionada, submetida ao processo de purificação em etanol em excesso de sais (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), quantificadas e encaminhadas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo (USP). As reações de sequenciamento foram feitas no sequenciador ABI3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), empregando-se o reagente BigDye® Terminator v3.1 cycle Sequencing kit (código 4337456) e o iniciador T7.

5.2.4 Análise e caracterização dos transcritos da serpina e do fator de inibição da tradução do hospedeiro (HTIF) obtidos na biblioteca de cDNA de teratócitos de *C. flavipes*

As sequências obtidas foram acessados no programa FinchTV (disponível em www.geospiza.com/finchtv) e analisados utilizando-se as ferramentas BLAST (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/) e BLAST2GO (disponível em www.blast2go.org).

Duas das sequências obtidas foram selecionadas para a completa caracterização do cDNA de transcritos identificados como serpina (*Cfserpina*) e fator de inibição da tradução do hospedeiro (*CfHTIF*). Assim, RNA foi novamente obtido de teratócitos de *C. flavipes* de forma semelhante àquela anteriormente descrita, sendo o material submetido ao procedimento para extensão da terminação 3', visto a necessidade de complementação das sequências

obtidas obtidas com o sequenciamento de diferentes clones contendo esses transcritos. A extensão para a terminação 3' foi obtida com a utilização do sistema Gene RACER[™] (Invitrogen[®]), seguindo as orientações do fabricante. Para caracterização da extremidade 3' foram conduzidas reações distintas, utilizando-se os iniciadores gene específicos *CfSerpinaF* (5'-ACAACTTCCGATCAACTGCA-3') e *CfHTIF* (5'-TAACTGGGACTTCAAATCAGCG AT-3'), respectivamente para os transcritos correspondentes a serpina a ao fator de inibição da tradução do hospedeiro, juntamente com o iniciador complementar ao adaptador disponível junto ao oligodT empregado na reação de transcrição reversa ("3'nested primer": 5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'). Essas reações consistiram de um ciclo de 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 2 min; e um ciclo de 72°C por 10 min, sendo conduzidas em volume final de 25 µL, contando com tampão de reação 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega[®]). O produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE e submetido ao processo de eletroforese para separação e observação dos amplicons obtidos, assim como descrito anteriormente. As bandas obtidas foram clonadas em vetor pGEM T Easy vector (Promega[®]), seguindo as orientações do fabricante, e as informações inseridas no plasmídeo foram acessadas de forma semelhante àquela descrita anteriormente, utilizando-se os iniciadores T7 e M13R. Após seleção dos amplicons a serem sequenciados, o produto de amplificação obtido foi purificado, quantificado e enviado para sequenciamento bidirecional junto ao CEGH/USP.

As sequências obtidas foram acessadas no programa FinchTV (www.geospiza.com/finchtv) e os cDNAs foram montados utilizando o programa Mega5.0. e traduzidos utilizando a ferramenta Translate, disponível no portal EXPASY (<http://expasy.org/tools/>). As proteínas obtidas tiveram seus domínios e funções analisados pela ferramenta InterProScan (<http://expasy.org/tools/>) e foram alinhadas com proteínas semelhantes selecionadas após buscas de similaridade com as ferramentas Blastx e Blastp no banco de dados do "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" (www.ncbi.nlm.nih.gov/). O alinhamento das *Cfserpina* foi feito utilizando-se o programa ClutalW (<http://expasy.org/tools/>) com as serpinas: Ag-serpin-1 [NCBI n. ABL67437, *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae)], Ag-serpin-2 [NCBI n. ABJ52801, *A. gambiae*], Dm-serpin-27A [NCBI n. NP_652024, *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae)], Hc-serpin [NCBI n. AAD09285, *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae)], Lb-serpin [NCBI n. ACQ83466.1, *Leptopilina boulardi* (Barbotin, Carton & Kelner-Pilau) (Hymenoptera: Figitidae)], Ms-serpin-1J [NCBI n. AAC47340, *Manduca sexta*

(L.) (Lepidoptera: Sphingidae)], Ms-serpin-3A (NCBI n. AAO21505, *M. sexta*), Ms-serpin-4A (NCBI n. AAS68503, *M. sexta*), Ms-serpin-5A (NCBI n. AAS68507, *M. sexta*), Nv-serpin-d [NCBI n. XP_001606111, *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Braconidae)] e Nv-serpin-f (NCBI n. XP_001607624, *N. vitripennis*). O alinhamento da CfHTIF foi realizado com a ferramenta MUSCLE, disponível no programa Mega5.0 (<http://www.megasoftware.net/>). A presença de peptídeo sinal nas proteínas analisadas foi determinada pela ferramenta SignalP 4.0, também disponível no portal ExPASy (<http://expasy.org/tools/>).

5.2.5 Determinação do padrão de expressão do Cfserpina e CfHTIF ao longo do desenvolvimento do parasitoide

5.2.5.1 Parasitismo e coleta de tecidos

Lagartas de *D. saccharalis* foram parasitadas conforme descrito anteriormente, sendo as lagartas controle submetidas ao mesmo processo de seleção para avaliação. Lagartas controle e parasitadas foram avaliadas após 1, 3, 5, 7 e 9 dias correspondentes à data do parasitismo e serão referidos de agora em diante por DAP, tanto para os insetos controle (não-parasitados), como para os parasitados. Foram utilizadas pelo menos cinco lagartas em cada período amostral/tratamento.

Para a coleta dos tecidos, as lagartas foram esterilizadas em 70% etanol (5 min), lavadas em dois banhos sucessivos em água estéril e dissecadas em tampão anticoagulante em condições assépticas. Os diferentes tecidos obtidos do hospedeiro (hemócitos, tecido adiposo visceral, tecido adiposo periférico e intestino) e derivados do parasitismo (teratócitos) foram coletados e imediatamente armazenados em solução de RNA later (Invitrogen®). Após período de infiltração a 4°C por 16 h, as amostras foram armazenadas a -20°C até sua utilização para extração do RNA.

5.2.5.2 Síntese de cDNA e PCR semiquantitativo

O padrão de transcrição de Cfserpina em teratócitos de *C. flavipes* foi avaliado nos dias 5, 7 e 9 após o parasitismo, sendo também verificada a expressão desse transcrito em hemócitos de hospedeiros parasitados e não-parasitados. Já para o CfHTIF, dada à sua origem viral e o fato de que as partículas de vírus de poliDNA associadas a parasitoides infectam

inúmeros tecidos do hospedeiro, o padrão de transcrição foi investigado em tecidos outros que os teratócitos. Assim, foram utilizados hemócitos, tecido adiposo visceral, tecido adiposo periférico e intestino médio de lagartas parasitadas e não-parasitadas, nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 após o parasitismo.

O RNA total dos tecidos coletados foi extraído e quantificado conforme descrito anteriormente, sendo o mesmo utilizado para a síntese de cDNA em reação de transcrição reversa de volume final de 12 µL, contando com 90 ng de RNA total, 0,56 µL de 10 mM de oligodT [5'GCTGTCACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₂₄], 1 µL de mistura de dNTPs a 10 µM cada e água MilliQ estéril. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C por 5 min, sedimentadas por uma breve centrifugação e colocadas em gelo. Foram adicionados 4 µL do tampão 5x de síntese da primeira fita ("first strand buffer"), 2 µL de 100 mM DTT (ditiotretol), 1 µL de água MilliQ estéril e 1 µL da transcriptase reversa M-MLV. As amostras foram agitadas suavemente, incubadas a 37°C por 50 min e aquecidas a 70°C por 15 min.

Os cDNAs obtidos para os diferentes tecidos, nos diversos tratamentos, foram utilizados para a realização de análises semiquantitativas da expressão de *Cf*serpina e *Cf*HTIF. Para as reações tendo como alvo a *Cf*serpina, foram utilizados os iniciadores SerpinaF (5'-ACAACCTCCGATCAACTGCA-3') e SerpinaR (5'-TAGCATCAAGTTCAGGCAGC-3'), em reações programadas a 94°C por 2 min (1x); 94°C por 30 s, 50°C por 30 s e 72°C por 1 min (30x); seguidos por um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. As reações para verificação do nível de transcrição do *Cf*HTIF foram conduzidas em reações programadas a 94°C por 2 min (1x); 94°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min (30x); seguidos por um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min, utilizando os iniciadores BracoF (5'-ATGAATACTTTCTTGTTTTGTTTTGTT-3') e BracoR (5'-CGTCTAGGCTCAGTGAGTTGTTTTAC-3'). O gene da actina foi selecionado como gene de referência e o nível de transcrição do mesmo foi avaliado em reações de PCR com programa semelhante àquele utilizado para o gene *Cf*HTIF, utilizando, porém, os iniciadores ActinF (5'-TTCACCACCACCGCYGAG-3') e ActinR (5'-ATACCGGGGTACATGGTGG-3'). Todas as reações foram conduzidas em volume final de 25 µL, contando com tampão de reação 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega®).

Os fragmentos obtidos nas reações de amplificação foram separados via eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2),

contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), sob voltagem constante (100V), em cuba horizontal de eletroforese (Biorad®), contendo o mesmo tampão de preparação do gel. A visualização das bandas foi feita em transiluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging systems). As imagens obtidas foram submetidas ao processo de análise de imagens utilizando o software GelQuant 2.7.0 (DNR Imaging Systems Ltda), para determinação da intensidade de coloração das bandas obtidas para os amplicons de interesse.

Para obtenção da expressão relativa dos transcritos de *Cfserpina* e *CfHTIF* de *C. flavipes* nos diferentes tecidos analisados ao longo do desenvolvimento do hospedeiro, o valor de intensidade de coloração obtido para o transcrito alvo (*Cfserpina* ou *CfHTIF*) foi dividido pelo valor obtido para gene de referência, a actina, para cada amostra estudada. Todas as reações foram realizadas em triplicatas para obtenção de valores médios.

5.3 Resultados

A análise inicial dos transcritos produzidos por teratócitos de *C. flavipes* resultou na caracterização e identificação putativa de dois transcritos, possivelmente relacionados à regulação da resposta imunológica (serpina - *Cfserpina*) e/ou desenvolvimento (fator de inibição da tradução de eucariotos – *CfHTIF*) de lagartas hospedeiras de *D. saccharalis*.

5.3.1 *Cfserpina*

A caracterização do transcrito *Cfserpina* levou à identificação putativa de proteína pertencente à superfamília das serpinas, sendo a maior homologia obtida com a serpina do tipo 3/4, caracterizada via anotação do genoma do parasitoide pupal *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) (número de acesso: XP_001606111.2, *Evalue*: $2e^{-110}$; identidade: 47%). A serpina predita de teratócitos de *C. flavipes* apresentou peso molecular de 45,93 kDa e ponto isoelétrico de $pI = 5,58$, contando com uma fase aberta de leitura de 1.350 nucleotídeos dos quais 1.236 nucleotídeos codificam para uma proteína de 411 aminoácidos, com o sítio de clivagem do peptídeo sinal localizado entre os aminoácidos 25 e 26 (Figura 5.1). A identificação putativa desta proteína foi feita utilizando-se a ferramenta InterproScan, dado o reconhecimento de domínio comum às serpinas (score = $5.4e^{-118}$), representado pela cadeia peptídica entre os aminoácidos da posição 9 à 409. Duas outras regiões de domínio relacionadas às proteínas do grupo das serpinas foram identificadas. Os domínios 2-

antitrombina, representado pela sequência peptídica do aminoácido 304 ao 358 (score = $1.9e^{-70}$), e 1-alfa-1-antitripsina (score = $1.3e^{-44}$), representado pelos aminoácidos das posição 359 à 409. Ainda, também foi possível identificar o sítio catalítico conservado das serpinas, contido no domínio antitripsina, entre as posições 382 e 392 (Figura 5.1).

Quando comparada a outras serpinas de insetos, com função comprovada de inibição ou não sobre a cascata de melanização, foi possível verificar que a *Cf*serpina apresentou centro reativo conservado, homólogo àquele de serpinas que atuam comprovadamente na inibição de proteases. O centro reativo foi composto pelos aminoácidos ácido glutâmico (E), nas posições P17 e P16, glicina (G), na posição P15, serina (S), nas posições P14 e P11, e alanina (A), nas posições P12 e P10 (Figura 5.2). Assim, foi verificado que a ligação da *Cf*serpina a ser rompida durante a interação do inibidor com a protease-alvo situa-se entre os aminoácidos arginina (R - posição 370) e serina (S - posição 371) (Figura 5.2).

atactttttaaaca

atgattcaccaaacgaaatggctgatgggatccggttttaatatattgacagtggttaaactgc
M I H Q T K W L M G S V L I L T V L N C 20
gaaaattcattggcatcgccggaatgaagaaaatttaagagcagtttccggtggaatg
E N S L A S P E N E E N L R A V S G G M 40
aaccaattttcggcagatttttacaaaacctcatcggaatcacaaaagataatcttatc
N Q F S A D F Y K T S S E I T K D N L I 60
tgctcaccgctaagtgctggtattgtattgtctatggcagcgtacggcgctcgtggaaac
C S P L S A G I V L S M A A Y G A R G N 80
acggaaaaacaaatgcgaacaagtttacgtatgcctgaaaacgacgctgtcggtaagagc
T E K Q M R T S L R M P E N D A V G K S 100
ggtttccagtccttattgataccctcaatagtgatgaagaaagttcagctaaaactagcg
G F Q S L I D T L N S V K K V Q L K L A 120
caaaaaattttcacaaactacgggcttcgaaatgaaacctgatttcaaagctataaccgaa
Q K I F T T T G F E M K P D F K A I T E 140
aacaacttccgatcaactgcacaaagtttagattttgctaaagctgtcagagtccttcacaa
N N F R S T A Q S L D F A K A V E S S Q 160
acgataaataaatggtgcaaagaacaaacgaacagcagcattaaagagatcatccaacca
T I N K W C K E Q T N S S I K E I I Q P 180
gatgacttgaatggagctgtgatgggttttgcataaacgcagtttatttcaaaggtaactgg
D D L N G A V M V L L N A V Y F K G N W 200
ctgtcaaagtttaaggtgaacaaactttacgacagccattccatgtcagatgaaaatacc
L S K F K G E Q T L R Q P F H V D E N T 220
acgaaagacgctgatatgatgcataaaaaaacgcgttcaattatggagagctgcctgaa
T K D A D M M H Q K N A F N Y G E L P E 240
cttgatgctatttttgtagaacttccatacgagaaagaagacgaaaatgatgcaatcagt
L D A I F V E L P Y E K E D E N D A I S 260
atgtttataattctgcctaacaatgttaatgggtctttcaaaatctgaaaattctttgcac
M F I I L P N N V N G L S K S E N S L H 280
accctcaacttcaaaaacatgcatgaaaataaaagaatgactgaaatgcacttgtacatg
T L N F K N M H E N K R M T E M H L Y M 300
cctaaattcaaaaattgagagcacacttcagctccagccgattttggagaaggtgggaatg
P K F **K I E S T L Q L Q P I L E K V G M** 320
actgatatgttctcagacagcgtgattttacgggtataacagatttccgccttaaaa
T D M F S D S A D F T G I T D S P P L K 340
gtgagcaaagtaattcaaaaggcattcattgaagtaaatgaagaaggaagtgaagcttca
V S K V I Q K A F I E V N E E G S E A S 360
gcagttacagcgggggtgatatcgtttagatcgctctaaaattccacaccctataaccgata
A V T A G V I S F R S S K I P H P I P I 380
acagtgatgattgacagaccctttatctatacgattgtccattctgcagcgaatgctggt
T V M I D R P F I Y T I V H S A A N A V 400
ttgttccaaggacatatatttccgagccggttttctaa**aaagtattgattggaaaaa**
L F Q G H I S E P V F - 411
aaaaaaaa

Figura 5.1 - Sequência de nucleotídeos (minúsculas) e de aminoácidos (maiúsculas) da serpina putativa (*Cfserpina*) de teratócitos de *Cotesia flavipes*. Sequência nucleotídica: região não-traduzida da terminação 5' (UTR-5') – em negrito; códon de inicialização de leitura (ATG) - sublinhado simples; códon de finalização de leitura - sublinhado duplo; região não-traduzida da terminação 3' (UTR-3') – em itálico. Na sequência peptídica: peptídeo sinal - em negrito; domínio 2 antitrombina - marcado em cinza; domínio 1 antitripsina - marcado em preto; sítio catalítico conservado de serpinas - marcado em preto, com aminoácidos em negrito

Figura 5.2 - Alinhamento múltiplo do centro reativo da Cfserpina de teratócitos de *C. flavipes* com o de outras serpinas de insetos disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta MUSCLE. “↓” indica a posição de clivagem da serpinas pela proteínase-alvo, “*” = posições com resíduos idênticos, “:” = posições com substituições conservadas, “.” = posições com substituições semi-conservadas. As sequências destacadas em cinza são serpinas com função predita ou que comprovadamente inibem a cascata de melanização. Ag = *Anopheles gambiae*; Dm = *Drosophila melanogaster*; Hc = *Hyphantria cunea*; Lb = *Leptopilina boulardi*; Ms = *Manduca sexta*; Nv = *Nasonia vitripennis*; Cf = *Cotesia flavipes*

A análise do padrão de transcrição da Cfserpina indicou que a maior produção desse transcrito em teratócitos de *C. flavipes* ocorre já no quinto dia após o parasitismo, apenas 24-48h após a eclosão das larvas do parasitoide, a qual ocorre entre os dias 3 e 4 após o parasitismo, nas condições experimentais utilizadas (PINHEIRO; ROSSI; CÔNSOLI, 2010) (Figura 5.3). Os níveis de transcrição da Cfserpina reduzem em cerca de 25% no decorrer do desenvolvimento do parasitoide, mas a transcrição é mantida até o término da fase interna do desenvolvimento larval de *C. flavipes*, entre o nono e décimo dias após o parasitismo, nas condições de criação utilizadas (PINHEIRO; ROSSI; CÔNSOLI, 2010) (Figura 5.3). Não foi detectada a presença desse transcrito em tecidos de lagartas não-parasitadas, indicando que se trata de um transcrito específico do parasitismo.

Figura 5.3 - Caracterização temporal da expressão do transcrito *Cfserpina* em teratócitos de *Cotesia flavipes*, ao longo do desenvolvimento do parasitoide em lagartas de *Diatraea saccharalis*

5.3.2 *CfHTIF*

O transcrito *CfHTIF* isolado de biblioteca de teratócitos de *Cotesia flavipes* apresenta 607 nucleotídeos, dos quais 477 compõem a fase aberta de leitura que codifica para uma proteína com cadeia de 158 aminoácidos e sítio de clivagem do peptídeo sinal localizado entre os aminoácidos 22 e 23 (Figura 5.4). Esta proteína, de peso molecular de 17,47 kDa e ponto isoelétrico $pI = 9,07$, apresenta homologia a fatores inibidores da tradução em eucariotos, como aqueles presentes no genoma de vírus de poliDNA associado a outras espécies de parasitoides do gênero *Cotesia*, como, por exemplo, ao fator de inibição de tradução produzido pelo bracovírus associado a *Cotesia glomerata* (L.) (Hymenoptera: Braconidae) (número de acesso: ACN66640.1, *Evalue*: $2e^{-88}$; identidade: 83%) (Figura 5.5).

tgttcgacacaagtggtctgaagacatcacaaagtcataaca

atgaatactttcttgttttgttttgttctcgctggttggttagtgggccaggaagtaact
M N T F L F C F V L A V G L V G Q E V T 20
 gggacttcaaatacagcgataccagactccaacaagtcaaggaaatgcaaacgcgaatact
G T S N Q R Y Q T P T S Q G N A N A N T 40
 ggcgaaactagtcaagaaagccgtggatggcttgtcaaaactttttactaatttgggagaa
 G E L V K K A V D G L S K L F T N L G E 60
 caagtacaatctaaacttaatccgcaacaattggacgatttcttttagagaaaacaatcac
 Q V Q S K L N P Q Q L D D F F R E N N H 80
 atattcagtaatacaaacgaagagcaagtttaataaagtagtcaatgacgttaaaaacgct
 I F S N Q T K S K F N K V V N D V K N A 100
 ggaacacagggttaacttatcgagtactagctctgatttcaataaactgatagttgcagtt
 G T Q V N L S S T S S D F N K L I V A V 120
 ggttctgatctatcttctgttgttcaaaagtttgcaaaagatattccaatccctctgaa
 G S D L S S V V Q K F A K D I P N P S E 140
 gttataacaacgtatcaatgattatgtaaaacaactcactgagcctagacgtaatt~~aa~~**ttc**
 V I Q R I N D Y V K Q L T E P R R N - 158
gattgacggctactgtttgaaatgtactcccgatttgttgggctataataaataatcaat
gcattcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 5.4 - Sequência de nucleotídeos (minúsculas) e de aminoácidos (maiúsculas) do fator de da tradução (CfHTIF) isolado de teratócitos de *Cotesia flavipes*. Sequência nucleotídica: região não-traduzida da terminação 5' (UTR-5') – em negrito; códon de inicialização de leitura (ATG) - sublinhado simples; códon de finalização de leitura - sublinhado duplo, região não-traduzida da terminação 3' (UTR-3') – em itálico. Na sequência peptídica: peptídeo sinal - em negrito

A análise do alinhamento demonstrou que os fatores de inibição da tradução de eucariotos produzidos por vírus de poliDNA associados a espécies de *Cotesia* (bracovirus) são extremamente conservados, ocorrendo na forma de múltiplos genes, com três cópias identificadas em *Cotesia congregata* e duas em *Cotesia plutellae*. Os bracovirus associados a estas espécies compartilham um fator de inibição idêntico, sendo o fator de inibição 15a do bracovirus de *C. plutellae* (CpBV15a) idêntico ao HTIF1 do bracovirus de *C. glomerata* (CgHTIF1) (Figura 5.5). Esses dois fatores de inibição, CpBV15a e CgHTIF1, são, por sua vez, aqueles que compartilham a menor similaridade (52%) ao fator de inibição isolado de teratócitos de *C. flavipes* (Figura 5.5). Já os fatores de inibição CgHTIF3, de *C. glomerata*, e CpBV15B, de *C. plutellae*, são os que compartilham as maiores similaridades em relação àquele de *C. flavipes*, 82 e 81%, respectivamente (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Alinhamento múltiplo da proteína C_fHTIF com fatores de inibição da tradução em hospedeiros (HTIF) produzidos por vírus de poliDNA (PDV) associados a outras espécies de parasitoides do gênero *Cotesia*, utilizando a ferramenta ClustalW. “*” = posições com resíduos idênticos, “:” = posições com substituições conservadas, “.” = posições com substituições semiconservadas. Sequências de HTIF utilizadas no alinhamento são identificadas pelo seu número de acesso (sigla entre parênteses) e são oriundas da análise do genoma dos vírus de poliDNA associados aos parasitoides Cg = *Cotesia glomerata* e Cp = *Cotesia plutellae*

A transcrição do gene do fator de inibição da tradução produzido pelos teratócitos de *C. flavipes* foi detectada logo após a liberação dos teratócitos na hemocele do hospedeiro, a partir do 5º dia após o parasitismo. O nível de transcrição verificado permaneceu praticamente inalterado ao longo do desenvolvimento do parasitoide, até o período final da sua fase larval de desenvolvimento (9 DAP) (Figura 5.5). Níveis de transcrição bastante reduzidos também foram encontrados nos hemócitos de lagartas parasitadas por *C. flavipes* (Figura 5.5). Além de bastante inferior aos níveis de transcrição encontrados nos teratócitos, a transcrição do fator de inibição da tradução em hemócitos do hospedeiro só foi detectada 7 DAP, com ligeiro acréscimo à medida que a larva do parasitoide se aproximava do final de sua fase de desenvolvimento interna ao hospedeiro (Figura 5.5). Não foi detectado qualquer indício de transcrição do *CfHTIF* nos demais tecidos analisados (tecido adiposo periférico e visceral e

intestino médio) de lagartas parasitadas e não-parasitadas, incluindo os hemócitos de lagartas não-parasitadas.

Figura 5.6 - Caracterização temporal da expressão do transcrito do fator de inibição da tradução do hospedeiro (CfHTIF) de *Cotesia flavipes* em teratócitos (Δ) e hemócitos (◇) coletados de lagartas de *Diatraea saccharalis* ao longo do parasitismo

5.4 Discussão

5.4.1 CfSerpina

A serpina putativa codificada pelo transcrito *Cfserpina*, isolado de teratócitos de *C. flavipes*, apresenta domínios característicos, aminoácidos em posições conservadas e a composição do centro reativo característicos de serpinas (IRWING et al., 2000). Serpinas estão distribuídas em vários reinos e são responsáveis, principalmente, pela inibição de serino-proteinases, participando de diversos processos fisiológicos dada a sua atividade de regulação da atividade catalítica de enzimas (GETTINS, 2002; HUNTINGTON, 2011). Nos insetos, serpinas possuem diversos papéis fisiológicos dada a regulação de proteinases endógenas e, em relação a capacidade de resposta imunológica em insetos, as serpinas estão associadas à regulação de proteinases de origem microbiana, aos processos de agregação de hemócitos e à ativação das fenoloxidasas (KANOST; JIANG; YU, 2004).

Parasitoides utilizam diversas moléculas bioativas no processo de regulação hospedeira com o objetivo de anular o sistema imunológico de seus hospedeiros, sendo comuns as observações de redução da atividade das fenoloxidasas em insetos parasitados (COLINET et al., 2009; KITANO; WAGO; ARAKAWA, 1990; LU; BECK; STRAND,

2010; SHELBY et al., 2000; STRAND; PECH, 1995). A redução da atividade da fenoloxidase de larvas de *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) parasitadas por *Leptopilina boulardi* (Barbotin, Carton & Kelner-Pilau) (Hymenoptera: Figitidae) é mediada por uma serpina associada ao veneno do parasitoide, a qual inibe proteases que compõem a cascata de ativação das profenoloxidasas (COLINET et al., 2009).

Beck, Theopold e Schmidt (2000) demonstraram que o inibidor sintético Arg-PMSF, específico para proteases do tipo tripsina, possui efeitos similares aos do fluido do cálice do parasitoide *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae) sobre o sistema imunológico de seu hospedeiro, *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). Como a Cfserpina possui um aminoácido arginina na posição P1 de seu centro reativo, acredita-se que as proteinases-alvo desse inibidor sejam aquelas que realizam a hidrólise em posições específicas de peptídeos indicadas por esse aminoácido, no caso, as tripsinas (GETTINS, 2002). Assim, é provável que a Cfserpina secretada pelos teratócitos de *C. flavipes*, à semelhança do relatado para serpinas de outros parasitoides, esteja associada à inibição da ativação da fenoloxidase de seu hospedeiro por meio de inibição de serino-proteinases envolvidas nessa cascata de reações.

O fato de serpinas serem detectadas apenas no momento em que a larva do parasitoide eclode, sendo esse justamente o momento em que ocorre a dissociação da serosa do embrião e a liberação teratócitos, sugere que a sua provável ação sobre a resposta imunológica do hospedeiro seja voltada à proteção da larva do parasitoide, sendo o ovo de *C. flavipes* protegido por outros mecanismos ou por moléculas que sejam produzidas por outros tecidos. Há registros de parasitoides que são capazes de burlar o sistema de defesa imunológico do hospedeiro, evitando a encapsulação de seus ovos, mesmo na ausência moléculas associadas ao veneno e/ou vírus simbiotes, como *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) (DAVIES; VINSON, 1986). Em outras espécies tem sido identificadas a participação de partículas tipo vírus ou lectinas associadas à superfície do córion do ovo do parasitoide, como em *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) (FEDDERSEN; SANDER; SCHMIDT, 1986; KINUTHIA; SMITH; THEOPOLD, 1999) e *C. plutellae*, respectivamente (NALINI et al., 2008).

5.4.2 CfHTIF

A caracterização do cDNA CfHTIF de teratócitos de *C. flavipes* levou a identificação de um fator de inibição da tradução de eucariotos muito similar a um grupo de fatores de inibição da tradução produzidos por vírus simbiotes (vírus de poliDNA - PDV) de outras espécies de *Cotesia*, o qual está envolvido no processo de regulação hospedeira (BARANDOC; KIM, 2008, 2010; LEE; KIM, 2008; NALINI; KIM, 2009), sugerindo que o CfHTIF possa ser de origem viral. Assim, este seria o primeiro registro da utilização de teratócitos como máquina de produção de proteínas de origem viral (PDV) em Hymenoptera. A provável origem viral do CfHTIF foi reforçada pela detecção de seus transcritos em hemócitos do hospedeiro, seguindo padrão temporal de expressão muito próximo àquele obtidos nos teratócitos; porém, em níveis muito mais reduzidos.

Os fatores de inibição da tradução de hospedeiros relatados para bracovírus (vírus de poliDNA simbiotes de Braconidae) associados a *C. plutellae* (LEE; KIM, 2008) e *C. glomerata* (BARANDOC; KIM, 2008) interferem na capacidade de expansão de plasmatócitos e na síntese de proteínas de armazenamento pelo hospedeiro (BARANDOC; KIM, 2008; NALINI; KIM, 2009), sendo que o efeito de inibição pós-transcricional observado para a proteína de armazenamento SP1 de *P. xylostella* é dado pela inibição da formação de complexo funcional para o início da tradução, dada pelo reconhecimento de região UTR da terminação 5' do transcrito alvo e sequestro do fator de iniciação da tradução em eucariotos, eIF4A (SURAKASI; NALINI; KIM, 2011).

Os vírus de poliDNA se replicam nas células do cálice de parasitoides hospedeiros e, quando depositados juntamente com os ovos, infectam diversas células do hospedeiro, onde utilizam a maquinaria de expressão das células para a transcrição de seus genes, contribuindo para que ocorra a supressão do sistema imunológico e alterações da composição química dos tecidos do hospedeiro (WEBB, STRAND, 2005). A inibição pós-transcricional observada para as HTIF na síntese proteica do hospedeiro (SURAKASI; NALINI; KIM, 2011) pode influenciar diretamente a nutrição do parasitoide, dado o redirecionamento dos nutrientes disponíveis para uso pelo parasitoide em desenvolvimento (NALINI; KIM, 2007b). As HTIFs também podem atuar de forma indireta, causando efeitos imunossupressores em seus hospedeiros, provavelmente em função da inibição da síntese de proteínas necessárias para o processo de resposta imune (NALINI; KIM, 2007a).

Apesar dos teratócitos não realizarem divisão celular, essas células sofrem processo de hipertrofia e poliploidia o que permite a manutenção de alta atividade de síntese, mesmo

sem aumento no número de células, produzindo substâncias para as mais diversas funções (BELL et al., 2004; CÔNSOLI et al., 2007; DAHLMAN, 1990; DAHLMAN et al., 2003; QIN; GONG; DING, 2000; ZHANG; DAHLMAN; JÄRLFORS, 1997). Uma proteína identificada como TSP14, com a função de inibir a síntese proteica do hospedeiro, foi isolada de teratócitos do parasitóide *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) (DAHLMAN et al., 2003), sendo sua estrutura primária e função semelhantes à proteína VHv1.1 derivada do vírus de poliDNA simbiote de *Campoletis sonorensis* (Cameron) (Hymenoptera: Ichneumonidae), no que se refere ao posicionamento de resíduos de cisteína (KIM, 2005). A proteína CfHTIF descrita nesse trabalho não possui os resíduos conservados de cisteína ou homologia com as proteínas dos teratócitos de *M. croceipes* ou do vírus simbiote de *C. sonorensis*.

A expressão detectada nos hemócitos de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* é um indicativo da possível origem viral da CfHTIF, visto a conhecida capacidade de infecção de tecidos hospedeiros pelos bracovirus associados a parasitoides (TRUDEAU; WITHERELL; STRAND, 2000; WEBB, STRAND, 2005).

Na interação *C. flavipes*-*D. saccharalis*, sabe-se que nas lagartas parasitadas, as proteínas de armazenamento (proteínas de aproximadamente 75 kDa) têm sua expressão reduzida a partir do sexto dia após o parasitismo (SALVADOR; CÔNSOLI, 2008). Visto que a expressão do transcrito CfHTIF ocorre a partir do quinto dia após o parasitismo, espera-se que a CfHTIF seja responsável pela inibição da síntese proteica observada. Estudos futuros voltados para a avaliação dos efeitos da CfHTIF no hospedeiro serão úteis para comprovação dessa hipótese e para avaliação do potencial dessa proteína no controle de pragas.

5.5 Conclusões

- Teratócitos de *C. flavipes* produzem proteínas com função putativa voltada à regulação hospedeira;
- O transcrito Cfserpina codifica para uma serpina altamente homóloga àquelas envolvidas na inibição da ativação da cascata de fenoxidase do sistema imunológico de insetos;
- O transcrito CfHTIF codifica para proteína homóloga a fatores de inibição da tradução em eucariotos;

- A proteína codificada pelo transcrito *CfHTIF* é altamente similar a proteínas produzidas por vírus de poliDNA simbioses associados a outras espécies de *Cotesia*;
- Teratócitos de *C. flavipes* servem como fábrica de proteínas de origem viral voltadas à regulação hospedeira;
- Transcritos *CfHTIF* também são expressos em hemócitos do hospedeiro parasitado;
- A transcrição de *Cfserpina* e *CfHTIF* é iniciada no dia 5 após o parasitismo e se estende até o final do desenvolvimento larval do parasitoide.

Referências

- ASGARI, S.; RIVERS, D.B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 56, p. 313-335, 2011.
- BARANDOC, K.P.; KIM, Y. Identification of three host translation inhibitory factors encoded in *Cotesia glomerata* bracovirus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 218-226, 2008.
- BECK, M.; THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.46, n. 9, p. 1275-1283, 2000.
- BELL, H.A.; KIRKBRIDE-SMITH, A.E.; MARRIS, G.C.; EDWARDS, J.P. Teratocytes of the solitary endoparasitoid *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae): morphology, numbers and possible functions. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 335-343, 2004.
- CACCIA, S.; GRIMALDI, A.; CASARTELLI, M.; FALABELLA, P.; AGUILEOR, M.; PENNACCHIO, P.; GIORDANA, B. Functional analysis of a fatty acid binding protein produced by *Aphidius ervi* teratocytes. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 2012, in press.
- CARTON, Y.; POIRIÉ, M.; NAPP, A.J. Insect immune resistance to parasitoids. **Insect Science**, London, v. 15, n. 1, p. 67-87, 2008.
- COLINET, D.C.; DUBUFFET, A.; CAZES, D.; MOREAU, S.; DREZEN, J-M.; POIRIÉ, M. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 33, n. 5, p. 681-689, 2009.
- CÔNSOLI, F.L.; LEWIS, D.; KEELEY, K; VINSON, S B. Characterization of a cDNA encoding a putative chitinase from teratocytes of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 122, n. 3, p. 271-278, 2007.

- DAHLMAN, D.L. Evaluation of teratocyte functions: an overview. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3-4, p. 159-166, 1990.
- DAHLMAN, D.L.; VINSON, S.B. Teratocytes: developmental and biochemical characteristics. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and Pathogens of insects**. New York: Academic Press, 1993. chap. 5, p. 145-165.
- DAHLMAN, D.L.; RANA, R.L.; SCHEPERS, E.J.; SCHEPERS, T.; DILUNA, F.A.; WEBB, B.A. A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 527-534, 2003.
- DANNEELS, E.L.; RIVERS, D.B.; DE GRAAF, D.C. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: recent discovery of an untapped pharmacopee. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 494-516, 2010.
- DAVIES, D.H.; VINSON, S.B. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiophiles nigriceps* of encapsulation in vitro by haemocytes of host *Heliothis virescens*: possible role for fibrous layer in immunity. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 12, p. 1003-1010, 1986.
- FALABELLA, P.; TREMBLAY, E.; PENNACCHIO, F. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n.1, p. 1-9, 2000.
- FALABELLA, P.; RIVIELLO, L.; DE STRADIS, M.L.; STIGLIANO, C.; VARRICCHIO, P.; GRIMALDI, A.; EGUILEOR, M.; GRAZIANI, F.; GIGLIOTTI, S.; PENNACCHIO, F. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 801-813, 2009.
- FEDDERSEN, I.; SANDER, K; SCHMIDT, O. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. **Experientia**, Basel, v. 42, n. 11/12, p. 1278-1281, 1986.
- FUHRER, E.; ELSUFTY, R. Produktion fungistatischer Metabolite durch Teratocyten von *Apanteles glomeratus* L. (Hym., Braconidae). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 21-25, 1979.
- FUEHRER, E.; WILLERS, D. The anal secretion of the endoparasitic larva *Pimpla turionellae*: sites of production and effects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 361-367, 1986.
- GETTINS, P.G.W. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, n. 12, p. 4751-4804, 2002.
- GLATZ, R.V.; ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 12, p. 545-554, 2004.

- GOPALAPILLAI, R.; KADONO-OKUDA, K.; OKUDA, T. Molecular cloning and analysis of a novel teratocyte-specific carboxylesterase from the parasitic wasp, *Dinocampus coccinellae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 1171-1180, 2005.
- GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 11, p. 1-16, 2011.
- HOCHULI, A.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B., Analysis of endoparasitoid-released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae) *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 823-833, 1999.
- HUNTINGTON, J.A. Serpin structure, function and dysfunction. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, London, v. 9, n. 1, p. 26-34, 2011.
- IRVING, J.A.; PIKE, R.N.; LESK, A.M.; WHISSTOCK, J.C. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. **Genome Research**, New York, v. 10, n. 12, p. 1845-1864, 2000.
- JOINER, R.L.; VINSON, S.B.; BENSKIN, J.B. Teratocytes as a source of juvenile hormone activity in a parasitoid–host relationship. **Nature New Biology**, London, v. 246, n. 152, p. 120-121, 1973.
- KADONO-OKUDA, K.; WEYDA, F.; OKUDA, T. *Dinocampus (Perilitus) coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: Its accumulative property, localization and characterization. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 1073-1080, 1998.
- KAESLIN, M.; REINHARD, M.; BÜHLER, D.; ROTH, T.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* is a complex mixture and has multiple biological effects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 696-694, 2010.
- KANOST, M.R.; JIANG, H.; YU, X-Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 198, n. 1, p. 97-105, 2004.
- KIM, Y. Identification of host translation inhibitory factor of *Campoplex sonorensis* ichnovirus on the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 59, n. 4, p. 230-244, 2005.
- KINUTHIA, W.; LI, D.; SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U. Is the surface of endoparasitic wasp eggs and larvae covered by a limited coagulation reaction? **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 501-506, 1999.
- KITANO, H.; WAGO, H.; ARAKAWA, T. Possible role of teratocytes of the gregarious parasitoid, *Cotesia* (= *Apanteles*) *glomerata* in the suppression of phenoloxidase activity in the larval host, *Pieris rapae crucivora*. **Archives of insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3/4, p. 177-185, 1990.

LU, Z.; BECK, M.H.; STRAND, M.R. Egf1.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 497-505, 2010.

LEE, S.; KIM, Y. Two homologous parasitism-specific proteins encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus and their expression profiles in parasitized *Plutella xylostella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 67, n. 4, p. 157-171, 2008.

MASASHI, H.; TANAKA, T. *Cotesia kariyai* teratocytes: growth and development. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 31-41, 2001.

MOREAU, S.J.M.; GUILLOT, S. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1209-1223, 2005.

NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 149-159, 2003.

NAKAMATSU, Y.; FUJII, S.; TANAKA, T. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 48, n. 11, p. 1041-1052, 2002.

NALINI, M.; KIM, Ya. A putative protein translation inhibitory factor encoded by *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses host hemocyte-spreading behavior. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 12, p. 1283-1292, 2007.

_____. An evidence for host translation inhibitory factor encoded in a polydnavirus, *Cotesia glomerata* Bracovirus, genome and its expression in parasitized cabbage white butterfly, *Pieris rapae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 351-356, 2007b.

_____. Transient expression of a polydnal viral gene, CpBV15b, induces immune and developmental alterations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 100, n. 1, p. 22-28, 2009.

NALINI, M.; CHOI, J.Y.; JE, Y.H.; HWANG, I.; KIM, Y. Immuno-evasive property of a polydnal viral product, CpBV-lectin, protects the parasitoid egg from hemocytic encapsulation of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 54, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação dos insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137 p.

PARRA, J.R.P.; MIHSFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder: Westview Press, 1992. chap. 6, p. 195-209.

PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Stage dependent influences of polydnviruses and the parasitoid larva on host ecdysteroids. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 55, n. 8, p. 707-715, 2009.

PINHEIRO, D.O.; ROSSI, G.D.; CÔNSOLI, F.L. External morphology of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) during larval development. **Zoologia**, Curitiba, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2010.

QIN, Q.L.; GONG, H.; DING, T. Two collagenases are secreted by teratocytes from *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) cultured *in vitro*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 76, n. 1, p. 79-80, 2000.

RANA, R.L.; DAHLMAN, D.L.; WEBB, B.A. Expression and characterization of a novel teratocyte protein of the braconid, *Microplitis croceipes* (Cresson). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 11, p. 1507-1516, 2002.

ROULEX-BONNIN, F.; RENAULT, S.; RABOUILLE, A.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y. Free serosal cells originating from embryo of the wasp *Diadromus pulchellus* in the pupal fat body of parasitized leek-moth, *Acrolepiosis assectella*. Are these cells teratocyte-like? **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 479-484, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F.L. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, Orlando, v. 45, n. 1, p. 103-110, 2008.

SCHEPERS, E.J.; DAHLMAN, D.L.; ZHANG, D. *Microplitis croceipes* teratocytes: In vitro culture and biological activity of teratocytes secreted protein. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, n. 9, p. 767-777, 1998.

SHELBY, K.S.; ADEYEYE, O.A.; OKOT-KOTBER, B.M.; WEBB, B. A. Parasitism-linked block of host plasma melanization. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 75, n. 3, p. 218-225, 2000.

STRAND, M.R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, London, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2008.

STRAND, M.R.; PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 31-56, 1995.

SURAKASI, V.P.; NALINI, M.; KIM, Y. Host translational control of a polydnvirus, *Cotesia plutellae* bracovirus, by sequestering host eIF4A to prevent formation of a translation initiation complex. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 609-618, 2011.

TRUDEAU, D.; WITHERELL, R.A.; STRAND, M.R. Characterization of two novel *Microplitis demolitor* polydnvirus mRNAs expressed in *Pseudoplusia includes* haemocytes. **Journal of General Virology**, London, v. 81, n. 12, p. 3049-3058, 2000.

VASS, E.; NAPPI, A.J. Developmental and immunological aspects of *Drosophila*–parasitoid relationships. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 6, p. 1259–1270, 2000.

VINSON, S.B. Effect of the parasitoid, *Campoletis sonorensis*, on the growth of its host *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1509-1514, 1972.

VINSON, S.B.; PENNACCHIO, F.; CÔNSOLI, F.L. The parasitoid–host interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed. **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific, 2001. p. 187-205.

WEBB, B.A.; STRAND, M.R. The biology and genomics of polydnviruses. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. San Diego: Elsevier, 2005. v. 6, p. 323-360.

YU, R-x.; CHEN, Y-f.; CHEN, X-x.; HUANG, F.; LOU, Y-g.; LIU, S-s. Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 22-29, 2007.

ZHANG, D.; DAHLMAN, D.L.; JÄRLFORS, U.E. Effects of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 577-585, 1997.

6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E EXPLORAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE UMA PROTEÍNA ASSOCIADA AO PARASITOIDE *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae)

Resumo

O endoparasitoide larval *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) utiliza-se de várias armas biológicas para garantir a colonização e o parasitismo bem sucedido do hospedeiro *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Dentre as diversas fontes de moléculas (glândulas de veneno, fluídos do cálice, secreções da larva, vírus de poliDNA, teratócitos) que este parasitoide utiliza no processo de regulação de seu hospedeiro, o cDNA de uma quitinase putativa foi caracterizado em teratócitos desse parasitoide e a atuação da mesma na cutícula do hospedeiro sugerida, assim como sua possível exploração no desenvolvimento de métodos de controle de insetos-praga via desestruturação da membrana peritrófica de insetos herbívoros. Assim, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar a atividade da quitinase putativa expressa nos teratócitos de *T. nigriceps* (*Tnchi*) via expressão heteróloga e avaliar o potencial biotecnológico da mesma para o controle de pragas via transgenia. A proteína *Tnchi* purificada após expressão em células de *Escherichia coli* apresentou capacidade de ligação às quitinas coloidal e cristalina, preparadas em solução aquosa, e à quitina coloidal, preparada em tampão com pH = 6,75. Porém, testes de toxicidade de plantas de fumo transgênicas que expressam a *Tnchi* via alimentação de lagartas de *H. virescens* com folhas da planta não afetaram a sobrevivência do inseto. Resultados semelhantes foram obtidos em ensaios de alimentação de lagartas com dieta artificial acrescida de proteína recombinante purificada após expressão em células de *E. coli*. No entanto, ensaios subsequentes demonstraram que a quitinase putativa isolada de teratócitos de *T. nigriceps* apresenta capacidade de inibição de crescimento microbiano. As propriedades avaliadas, a possível função dessa proteína no desenvolvimento do parasitoide e o potencial de exploração da mesma na transformação de plantas de interesse agrícola são discutidas.

Palavras-chave: Biotecnologia; Parasitoide; Quitolectina; Quitotrosidases; Teratócitos

Abstract

The larval endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) has a toolbox of biological weapons to secure host colonization and the successful parasitization of its host *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). The cDNA of a putative chitinase has been isolated and characterized from teratocytes of this parasitoid among the plethora of molecules from different sources (venom glands, calyx fluid, larval secretions, polidnavirus, teratocytes), and its role on the host cuticle has been suggested, as well as the potential for its exploitation for the development of insect pest control methods based on the interference with the host perithrophic membrane. Therefore, the objective of this work was to characterize the activity of the putative chitinase from teratocytes of *T. nigriceps* (*Tnchi*) produced using the *Escherichia coli* expression system and its potential to control *H. virescens* larvae when expressed into genetically-transformed tobacco plants. The purified *E. coli*-produced *Tnchi* proteins were active in conjugating with

colloidal and cristalyne chitins in water solution and with colloidal chitin in buffer (pH = 6.75). However, survival of *H. virescens* third instars was not affected when directly fed on tobacco leaves *Tnchi*-expressing transformed plants. Similar results were obtained when larvae were fed on artificial diet amended with *Tnchi* purified proteins. However, further assays have demonstrated the potential of this protein to inhibit microbial growth. The properties of the *Tnchi* protein, its possible role during parasitoid development and potential of use of *Tnchi*-transformed plants are discussed.

Keywords: Biotechnology; Chitolectins; Chitotriosidases; Parasitoid; Teratocytes

6.1 Introdução

A associação hospedeiro-parasitoide envolve uma fonte enorme de moléculas com ação reguladora e que apresentam potencial de exploração biotecnológica para os mais diversos fins, como a descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana e a utilização de substâncias para o desenvolvimento de plantas resistentes ao ataque de insetos-pragas (BECKAGE; GELMAN, 2004; GILL et al., 2006; RANA et al., 2002; STOLTZ, 1986; WANG; YANG, 2008). A diversidade de moléculas associadas a parasitoides é devida à história evolutiva desses insetos e à grande variedade de estratégias de exploração hospedeiras desenvolvidas (PENNACCHIO; STRAND, 2006; VINSON, 1998; VINSON; IWANTSCH, 1980). O interesse no entendimento dos processos de regulação hospedeira e o potencial biotecnológico de exploração de substâncias produzidas por parasitoides permitiu a identificação e caracterização de várias dessas moléculas (BECKAGE, 1998; DAHLMAN, 1990; FEDDERSEN; SANDER; SCHMIDT, 1986; FUEHRER; WILLERS, 1986; HOCHULI; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 1999; LAVINE; BECKAGE, 1995; NAKAMATSU; TANAKA, 2003; RANA et al., 2002; VINSON, 1972). Apesar de muitos estudos da interação hospedeiro-parasitoide serem concentrados em moléculas derivadas do veneno (ASGARI; RIVERS, 2011; DANNEELS; RIVERS; DE GRAAF, 2010; KAESLIN et al., 2010; MOREAU; GUILLOT, 2005; NAKAMATSU; TANAKA, 2003) ou dos vírus simbioses de poliDNA (PDV) (GLATZ; ASGARI; SCHMIDT, 2004; WEBB; STRAND, 2005), a única aplicação prática da utilização de moléculas derivadas do processo de regulação hospedeira por parasitoides, para o controle de insetos-praga, foi demonstrada para a proteína inibidora de síntese proteica do hospedeiro, TSP14, produzida por teratócitos de *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) (RANA et al., 2002; MAITI et al., 2003). No entanto, o potencial biotecnológico das anquirinas produzidas pelos vírus de poliDNA simbioses de *Campoletis sonorensis* (Cameron) (Hymenoptera: Ichneumonidae),

para aumentar a sobrevivência de células em sistemas de expressão heteróloga com baculovirus como sistema vetor também foi demonstrado (FATH-GOODIN et al., 2006b).

Teratócitos associados a outros sistemas hospedeiro-parasitoide também foram identificados como fonte de proteínas com ação de regulação do hospedeiro, como nas interações *Acyrtosiphum pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae) – *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) (FALABELLA; TREMBLAY; PENNACCHIO, 2000) e *Helithis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) – *C. sonorensis* (FATH-GOODIN, 2006a), demonstrando o potencial de moléculas produzidas por essas células na regulação do desenvolvimento do hospedeiro.

A produção de enzimas por teratócitos para auxiliar o imaturo do parasitoide em desenvolvimento, como no caso das collagenases (QIN; GONG; DING, 2000), a utilizar os recursos nutricionais de seu hospedeiro, também é conhecida em espécies do gênero *Cotesia* (NAKAMATSU; FUJII; TANAKA, 2002). Teratócitos de *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) também produzem uma enzima ao final da fase de desenvolvimento intracorpóreo da larva do parasitoide ao hospedeiro, inicialmente caracterizada como sendo uma quitinase (CÔNSOLI et al., 2007). Foi sugerido que esta enzima tivesse a função de auxiliar a ruptura do tegumento do hospedeiro para a saída da larva do parasitoide, permitindo que a mesma finalizasse seu desenvolvimento imaturo no ambiente extracorpóreo do hospedeiro para a egressão das larvas do parasitoide ou que essa proteína estivesse relacionada a atividade antimicrobiana (CÔNSOLI et al., 2007).

Como quitinases são enzimas responsáveis pela hidrólise de quitina e têm sido utilizadas no desenvolvimento de métodos de controle de pragas devido à sua propriedade de hidrolisar a quitina que compõe a membrana peritrófica dos insetos, interferindo na compartimentalização do processo de digestão, afetando, assim, a utilização dos nutrientes e limitando o desenvolvimento do inseto (BHATTACHARYA; NAGPURE; GUPTA, 2007; KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997), esse trabalho teve como intuito avaliar a interferência da quitinase derivada dos teratócitos de *T. nigriceps* (*Tnchi*) no desenvolvimento de lagartas *H. virescens*. A capacidade desta quitinase em afetar o processo de utilização do alimento por *H. virescens* e, conseqüentemente, sua sobrevivência, foi avaliada utilizando-se proteínas produzidas em sistema heterólogo de expressão (*Tnchi_rec*) e em plantas de fumo geneticamente modificadas.

6.2 Material e métodos

O sistema de clonagem direcional pENTR-D-TOPO (Invitrogen) foi utilizado como vetor doador para as etapas seguintes de transformação de plantas de fumo, *Nicotiana tabacum* cv Petit Havana, ou na transformação de células de *Escherichia coli* para a expressão heteróloga da proteína *Tnchi*. Para a clonagem do inserto *Tnchi* no vetor pENTR-D-TOPO foram utilizados os iniciadores GateF (5'-CACCATGTCAGCTATCAGCAATCAAGAA-3'), sendo os nucleotídeos em sublinhado duplo necessários para atividade da enzima topoisomerase, aqueles em itálico indicam o início da síntese protéica e os sublinhados simples os que correspondem ao molde do inserto *Tnchi*) e GateR (5'-TTAATTAGATTTTTTCCAATCGCAAATACCC-3', sequência correspondente à região terminal do molde do inserto *Tnchi*).

A amplificação do transcrito *Tnchi* com os iniciadores GateF e GateR foi conduzida em reação de 25 µL, composta por tampão de reação 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada um dos iniciadores, 0,5 U da enzima Taq platinum polimerase (Invitrogen®) e 1 µL do plasmídeo (aproximadamente 50 ng) contendo o inserto *Tnchi*, gentilmente cedido pelo Dr. S.B. Vinson (Texas A&M University, USA). A reação de PCR para amplificação do inserto *Tnchi* foi conduzida utilizando-se um ciclo de 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 2 min; e um ciclo de 72°C por 10 min. O produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação dos fragmentos foi feita em voltagem constante de 100V em cuba horizontal de eletroforese (Biorad®) contendo o mesmo tampão que o gel foi preparado. A visualização das bandas foi feita em transluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging systems).

A clonagem do inserto *Tnchi* foi feita via incubação à temperatura ambiente por 30 min, em reação contendo 1 µL de solução salina (1,2 M NaCl e 0,06 M MgCl₂), 3 µL de água e 1 µL do vetor [15-20 ng do plasmídeo linearizado em 50% glicerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT (dititreititol), 0,1% Triton X-100, 100 µg/ml albumina de soro bovino, 30 µM azul de bromofenol] e 1 µL do amplicon recém preparado (5-10 ng), conforme recomendações do fabricante. O vetor pENTR-D-TOPO contendo o inserto *Tnchi* foi introduzido em células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen®) pelo método da transformação química, conforme recomendações do fabricante. Em síntese, a transformação química das bactérias com plasmídeos contendo o inserto *Tnchi* consistiu da adição de 2 µL do produto da

reação de inserção do inserto *Tnchi* no vetor p-ENTR-D-TOPO em um tubo com 50 µL de células de *E. coli* TOP10, incubação em gelo por 30 min e choque térmico a 42°C por 30 s. Após o choque térmico, a amostra foi imediatamente colocada em gelo e foram adicionados 250 µL de meio SOC (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose) à temperatura ambiente e as células foram cultivadas por 1 h a 37°C, sob agitação constante (200 rpm). Após esse período, 100 µL das células cultivadas foram espalhadas em placa contendo meio LB sólido (1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl e 1,6 g de ágar em 100 mL de água) adicionado de canamicina (50 mg/L). Algumas das colônias obtidas foram cultivadas em meio LB líquido (1g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl em 100 mL de água) contendo canamicina (50 mg/L) por 16 h a 37°C e tiveram seus plasmídeos extraídos seguindo o método de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina consistiu da coleta e sedimentação (14.000g x 1 min) de 1 mL de células cultivadas por 16 h. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspense em 100 µL de tampão 25 mM Tris-HCl (pH = 8,0) – 10 mM EDTA, contendo 10 µL de RNase (10 mg/mL). Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de lise (200 mM NaOH e 1% SDS), a amostra foi misturada por inversão (6x), 120 µL de 5 M acetato de potássio (pH = 5,5) foram adicionados, a amostra foi novamente misturada por inversão (6x) e incubada por 3 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a amostra foi submetida a centrifugação (14.000 g x 2min) para remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA precipitado após adição de 200 µL de isopropanol gelado, misturado por inversão (10x), incubado em temperatura ambiente por 1 min e centrifugado (18.000 g por 1 min). O sobrenadante foi descartado, adicionados 500 µL de 70% etanol gelado, as amostras misturadas por inversão, centrifugadas (18.000 g por 1 min) e o sobrenadante descartado. O DNA sedimentado foi seco em temperatura ambiente e ressuspense em 30 µL de água Mili-Q estéril. Os plasmídeos extraídos foram diluídos para a concentração aproximada de 10 ng/µL e utilizados em reações de PCR para verificação da introdução do inserto *Tnchi* no vetor pENTR-D-TOPO, seguindo o mesmo ciclo de amplificação descrito anteriormente, em reação com volume final de 25 µL, composta por tampão de reação 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada um dos iniciadores M13F (5'-GTAAACGACGGCCAG-3') e GateR, e 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega®). Os resultados das reações de amplificação foram observados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, assim como descrito anteriormente. O plasmídeo

pENTR-D-TOPO contendo o inserto *Tnchi* teve sua composição avaliada por meio de sequenciamentos realizados no CBTEC-ESALQ-USP, utilizando os iniciadores M13F, *Tnchi*F1 (5'-CAAGGATGGATTTCGGTCGTT-3'), *Tnchi*F2 (5'-TTGAGTGCTCTGTGGCTG-3'), *Tnchi*R1 (5'-TTTGCCACCACGAGGTA-3'), *Tnchi*R2 (5'-ATAGGGA CCAGCACCAG-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Cada reação de sequenciamento foi feita em sequenciador ABI3100 DNA Analyser (Applied Biosystems), utilizando o reagente ABI DYEnamic ET (GE®), em reação com 150 ng de plasmídeo pENTR-D-TOPO contendo o inserto *Tnchi* e 5 pMol de cada iniciador.

6.2.1 Transformação de plantas de fumo

A transformação de plantas de fumo com o inserto *Tnchi* seguiu o seguinte fluxograma: subclonagem do inserto para retirada do vetor pENTR-D-TOPO e transferência para o vetor de transformação de plantas (pK7WG2D) por meio de reação com a enzima LR-clonase (Invitrogen®), transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo pK7WG2D+*Tnchi*, cocultivo de *A. tumefaciens* com discos de plantas de fumo para transferência do inserto *Tnchi* para o genoma das plantas e verificação da transformação via PCR e RT-PCR. O detalhamento das etapas é dado a seguir.

6.2.1.1 Subclonagem do inserto *Tnchi* do vetor pENTR-D-TOPO para o vetor pK7WG2D

A reação de transferência do inserto *Tnchi* do vetor direcional pENTR-D-TOPO para o vetor utilizado no procedimento de transformação de plantas compatível com *Agrobacterium tumefaciens* pK7WG2D, cedido pelo “Department of Plant Systems Biology, Universiteit Gent”, Bélgica, foi feita utilizando-se 150 ng do vetor de entrada (pENTR-D-TOPO+*Tnchi*), 150 ng do vetor de destino (pK7WG2D), 2 µL da enzima LR-clonase (Gateway LR clonase II enzyme mix) e 7 µL de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH = 8,0). A reação foi incubada a 25°C por 1 h. Para interrupção da reação, adicionou-se 1 µL de proteinase K (2 µg/µL) (Promega®) e a reação foi incubada a 37°C por 10 min. O produto da reação foi armazenado em a -20°C até utilização. Para multiplicar os plasmídeos pK7WG2D+*Tnchi* subclonados de pENTR-D-TOPO para pK7WG2D, células de *E. coli* TOP10 foram transformadas pelo método químico de transformação, seguindo as

recomendações do fabricante (Invitrogen®) e descrito anteriormente. Após transformadas, as células foram cultivadas por 16 h a 37°C, em meio LB sólido contendo espectinomicina (50 mg/L). A resistência de *E. coli* TOP10 à espectinomicina é conferida apenas às células transformadas com o vetor pK7WG2D ou, no caso, com o vetor pK7WG2D+*Tnchi*. As colônias formadas após o período de incubação foram cultivadas em meio LB líquido com espectinomicina (50 mg/L) e tiveram seus plasmídeos isolados pelo método da lise alcalina, assim como descrito anteriormente.

A confirmação da presença do inserto *Tnchi* no plasmídeo pK7WG2D foi feita por reação de PCR em volume final de 25 µL, utilizando 1 µL dos plasmídeos extraídos (50 ng/µL), tampão de reação 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, iniciadores específicos do transcrito *Tnchi*, GATEF e GATER, a 0,32 µM cada e 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega®). A programação da reação de PCR e a observação de seu produto foram feitas conforme descrição anterior. A integridade do inserto após subclonagem foi verificada por meio de sequenciamento, assim como descrito anteriormente, exceto pelo uso do iniciador M13.

6.2.1.2 Preparo de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* e transformação com os vetores pK7WG2D+*Tnchi* e pK7WG2D

Com a confirmação por sequenciamento da presença e integridade do inserto *Tnchi* no plasmídeo de transformação de plantas pK7WG2D extraídos de células de *E. coli* TOP10, os plasmídeos foram transferidos para células de *A. tumefaciens* (LBA4404). Para isso, foram preparadas células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* a partir de um estoque mantido em glicerol a -80°C. Estrias de *A. tumefaciens* foram feitas em placas de meio AB (0,5% glicose, 17,0 mM K₂HPO₄, 8,5 mM NaH₂PO₄, 18,5 mM NH₄Cl, 1,2 mM MgSO₄.7H₂O, 2,0 mM KCl, 70,0 µM CaCl₂, 9,0 µM FeSO₄.7H₂O, 1,6% ágar) acrescido do antibiótico rifampicina (100 mg/L). Após crescimento em placa, utilizou-se uma colônia isolada para o cultivo em 50 mL de meio AB líquido sem antibiótico, sob agitação de 200 rpm a 28°C, até o cultivo atingir densidade ótica a 600 nm entre 0,7 e 0,9. Ao atingir a densidade ótica desejada, as células foram centrifugadas (6.000g por 8 min a 4°C), o sobrenadante descartado, as células sedimentadas lavadas em 50 mL de tampão HEPES a 1 mM (pH = 7,0) (1x) e em 100 mL de água Milli-Q estéril (2x). Após nova sedimentação via centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão HEPES a 1mM (pH = 7,0) em glicerol a 10%, para posterior utilização no processo de eletroporação.

O processo de eletroporação consistiu da adição de 80 ng de plasmídeo pK7WG2D+*Tnchi* a 80 µL de células eletrocompetentes em cubeta de eletroporação mantida em gelo até o momento da eletroporação. Utilizou-se o programa padrão Ec2 (V = 2,5 kV) do eletroporador Biorad micropulser e, em seguida, 400 µL de meio SOC foram adicionados e as células cultivadas a 200 rpm a 28°C por 2 h. Após o cultivo, as células foram plaqueadas em meio AB com rifampicina (100 mg/L) e espectinomicina (50 mg/L).

O DNA das colônias formadas foi extraído pela coleta de pequena parte da colônia com auxílio de um palito de dentes estéril e a transferência das células para 50 µL de água estéril. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 min e adicionadas a um volume de água estéril. A reação de PCR para confirmação da presença do inserto *Tnchi* foi feita com os iniciadores GateF e GateR, conforme anteriormente descrito, utilizando 2 µL da solução de extração do DNA das colônias. Um controle com o plasmídeo pK7WG2D, sem o cDNA da quitinase, foi feito da mesma maneira; porém, sua presença foi verificada apenas pela observação de colônias formadas em meio com o antibiótico espectinomicina (50 mg/L).

6.2.1.3 Incubação das plantas com *A. tumefasciens* para infecção e transferência do cDNA *Tnchi*

Um pré-inóculo de *A. tumefasciens* contendo o plasmídeo pK7WG2D+*Tnchi* foi feito a partir de uma estria recente e cultivado em 50 mL de meio AB com espectinomicina (50 mg/L) a 28°C e 200 rpm, até densidade ótica entre 0,7 e 0,9 a 600 nm. Nesse ponto, as células foram centrifugadas (6.000g por 8 min a 4°C), o sobrenadante descartado e o sedimento de células obtido mantido em gelo enquanto o material vegetal foi preparado.

Folhas de *Nicotiana tabacum* cv Petit Havana, livres de fitopatógenos e sem sinais de danos mecânicos ou fisiológicos, foram coletadas e levadas ao laboratório. As folhas foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha e esterilizadas superficialmente pela rápida imersão em 70% etanol (1 s), seguida de banho em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min e enxagues sucessivos (5x) em água destilada estéril. As folhas foram secas em papel filtro previamente esterilizado, antes de sua utilização.

Após a lavagem das folhas, as células de *A. tumefasciens* foram ressuspensas em 20 mL de meio MS líquido, desprovido de sacarose e dos hormônios ácido naftaleno acético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) (NH₄NO₃ 1,65 g/L; KNO₃ 1,90 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,44 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,37 g/L; KH₂PO₄ 0,17 g/L; H₃BO₃ 6,20 mg/L; MnSO₄.7H₂O 16,90 mg/L; ZnSO₄.7H₂O 8,60 mg/L; KI 0,83 mg/L; Na₂MoO₄.2H₂O 0,25 mg/L; CuSO₄.5H₂O 25,00

µg/L; CoCl₂.6H₂O 25,00 µg/L; Na₂EDTA.2H₂O 41,25 mg/L; FeSO₄.7H₂O 27,85 mg/L; pantotenato de cálcio 1,00 mg/L; ácido nicotínico 5,00 mg/L; timina 1,00 mg/L; piridoxina 5,00 mg/L).

Discos de folhas esterilizadas superficialmente foram cortados com o auxílio de um cortador de metal esterilizado em fogo e incubados com a solução *A. tumefasciens* por 10 a 15 min. Após esse período, os discos foliares foram secos em papel filtro para retirar o excesso de *A. tumefasciens*, transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio MS completo semi-sólido (0,6% de ágar) [NH₄NO₃ 1,65 g/L; KNO₃ 1,90 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,44 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,37 g/L; KH₂PO₄ 0,17 g/L; H₃BO₃ 6,20 mg/L; MnSO₄.7H₂O 16,90 mg/L; ZnSO₄.7H₂O 8,60 mg/L; KI 0,83 mg/L; Na₂MoO₄.2H₂O 0,25 mg/L; CuSO₄.5H₂O 25,00 µg/L; CoCl₂.6H₂O 25,00 µg/L; Na₂EDTA.2H₂O 41,25 mg/L; FeSO₄.7H₂O 27,85 mg/L; sacarose 20,00 g/L; ácido naftaleno acético (ANA) 0,10 mg/L; 6-benzilaminopurina (BAP) 1,00 mg/L; pantotenato de cálcio 1,00 mg/L; ácido nicotínico 5,00 mg/L; timina 1,00 mg/L; piridoxina 5,00 mg/L] e cocultivados com *A. tumefasciens* por 3 dias. Após esse período, os discos foliares foram transferidos para placas de meio MS semi sólido contendo os antibióticos cefotaxima (200 mg/L, para interromper o desenvolvimento de *A. tumefasciens*) e canamicina (50 mg/L, para seleção dos calos transgênicos). Ao formarem brotos, os calos foram transferidos para frascos do tipo Magenta para alongamento. Os brotos alongados foram cortados dos calos e colocados em meio de enraizamento (MS completo desprovido dos hormônios) contendo canamicina (50 mg/L). Todas as fases de desenvolvimento ocorreram em câmara de crescimento regulada a 28°C, umidade relativa de 60% e fotofase de 16 h. Após enraizamento, os brotos foram transferidos para vasos contendo uma mistura com partes equivalentes de vermiculita e substrato comercial de plantio, sendo as plantas mantidas em casa de vegetação.

O mesmo processo de transformação foi feito utilizando-se *A. tumefasciens* com o vetor pK7WG2D vazio para obtenção de plantas controle.

6.2.1.4 Obtenção de plantas de fumo homozigotas contendo o inserto *Tnchi*

Para seleção de plantas de fumo transformadas homozigotas para o gene *Tnchi*, utilizou-se como referência o fenótipo de resistência a canamicina, conferido pelo gene *nptII*, pelo fato desse acompanhar o gene *Tnchi* inserido nas plantas. Plantas T₀ (transformantes primários) foram autofecundadas e as sementes da geração T₁ (primeira geração de plantas obtidas a partir da autofecundação dos transformantes primários) foram submetidas a teste de

crescimento em meio MS semi-sólido desprovido de hormônios e sacarose contendo canamicina (50 mg/L). Para isso, as sementes T₁ foram esterilizadas por meio de lavagem rápida em álcool 70% e incubação das sementes em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos seguida de 5 enxagues com água estéril e secagem das sementes em fluxo laminar. Foram semeadas aproximadamente 300 sementes de cada planta avaliada e as plantas cujas sementes germinaram em padrão de segregação 3:1 para o gene marcador de resistência a canamicina, segundo teste de χ^2 , foram selecionadas. Em seguida, dez plantas de cada planta T₁ resistentes ao meio com canamicina (homozigotas dominantes ou heterozigotas para o gene de resistência a canamicina e, conseqüentemente, para o gene *Tnchi*), foram transplantadas do meio com antibiótico para vasos e foram autofecundadas. As sementes T₂ de cada planta foram avaliadas novamente pelo teste de crescimento em meio contendo canamicina (50 mg/L) e as plantas T₂ que não segregaram (100% de resistência à canamicina) foram classificadas como homozigotas.

6.2.1.5 Extração de DNA das plantas transformadas e para confirmação da presença do inserto *Tnchi*

Para extração do DNA das plantas transformadas com o inserto *Tnchi* e das plantas controle, aproximadamente 100 mg de tecido foliar foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e macerados em almofariz e pistilo, previamente esterilizados por aquecimento a 180°C por 6 h. O pó resultante do processo de maceração foi transferido para tubo de 1,5 mL contendo 700 µL de tampão de extração (1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH = 8,0, 20 mM EDTA pH = 8,0, 1% PVP, 2% CTAB, 0,2% β-mercaptoetanol) a 60°C. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 15 min a 60°C, com agitação a cada 5 min. Após 5 min em temperatura ambiente, 600 µL de CIA (24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico) foram adicionados, as amostras homogeneizadas por inversão (25x), centrifugadas (18.000g a temperatura ambiente por 7 min) e a fase superior de cada amostra transferida para um novo tubo. Para cada amostra foram adicionados 200 µL de tampão de extração (sem β-mercaptoetanol) e 600 µL de CIA. As amostras foram homogeneizadas por inversão (25x), centrifugadas novamente e a fase superior coletada para nova lavagem, assim como descrito anteriormente. Após coleta do material, 500 µL de isopropanol foram adicionados e as amostras misturadas por inversão (1x) e centrifugadas (18.000g por 15 min) para descarte do sobrenadante. Ao sedimento obtido foram adicionados 500 µL de 70% etanol e as amostras incubadas a -20°C por, no mínimo, 10 min, antes de

serem submetidas a novo processo de centrifugação (18.000g x 15 min). O sobrenadante foi descartado e o resíduo seco à temperatura ambiente e ressuspense em 40 µL de tampão TE (10 mM Tris pH = 8,0, 1 mM EDTA pH = 8,0), acrescido de 0,01 mg/mL de RNase. As amostras foram incubadas a 37°C durante 30 min e armazenadas a 4°C para completa dissolução. Para armazenamento por períodos prolongados, as amostras foram mantidas a -20°C.

As amostras foram diluídas para aproximadamente 10 ng/µL e uma reação de PCR do inserto *Tnchi* foi realizada com os iniciadores GateF e GateR, conforme descrito anteriormente, para se verificar a integração do inserto *Tnchi* no genoma das plantas T₀.

6.2.1.6 Detecção da transcrição do inserto *Tnchi* em plantas T₁

A transcrição do inserto *Tnchi* inserido nas plantas de fumo transformadas resistentes a canamicina (50 mg/mL), com segregação 3:1, foi verificada na geração T₁ por meio de extração do RNA total das plantas, síntese de cDNA e reação de PCR gene-específico para *Tnchi*. O RNA das plantas avaliadas foi extraído de discos foliares de aproximadamente 100 mg, após maceração em nitrogênio líquido em almofariz com pistilo, previamente esterilizados por aquecimento a 180°C durante 6 h. O tecido macerado foi transferido para tubo de 1,5 mL, adicionado de 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen®), homogeneizado em vórtex, incubado por 5 min a temperatura ambiente e centrifugado (12.000g x 4°C x 15 min) para coleta da fase superior. Foram então adicionados 200 µL de clorofórmio, as amostras foram agitadas por inversão, incubadas a temperatura ambiente por 5 min, centrifugadas (12.000g x 4°C x 10 min) e o sobrenadante recuperado. Foram adicionados 550 µL de isopropanol e as amostras foram incubadas por 15 min em gelo, centrifugadas (12.000g x 4°C x 10 min) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspense em 1 mL de 70% etanol e novamente centrifugado (12.000g x 4°C x 5 min) para descarte do sobrenadante. As amostras foram secas (evaporação de resíduos de álcool) em temperatura ambiente e os sedimentos contendo o RNA total das plantas foi ressuspense em 40 µL de água MilliQ-estéril.

A síntese de cDNA foi feita utilizando a enzima de transcrição reversa M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen®), após extração e quantificação do RNA total (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A reação de transcrição reversa foi realizada em volume final de 12 µL, contando com 100 ng de RNA total, 0,56 µL de 10 mM de oligodT

[5'GCTGTCACGATACG CTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₂₄], 1 µL de dNTPs a 10 µM cada e água MilliQ estéril. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C por 5 min, sedimentadas por uma breve centrifugação e colocadas em gelo. Foram adicionados 4 µL do tampão 5x first strand buffer, 2 µL de 0,1 M DTT (ditiotretol), 1 µL de água MilliQ estéril e 1 µL da transcriptase reversa M-MLV. As amostras foram agitadas suavemente, incubadas a 37°C por 50 min e aquecidas a 70°C por 15 min.

A reação de PCR e observação do resultado da amplificação foram feitas conforme descrito no item 6.2, utilizando os iniciadores GateF e GateR.

6.2.1.7 Bioensaios de atividade inseticida das plantas transformadas com o inserto *Tnchi*

Para avaliar o potencial inseticida da proteína *Tnchi*, bioensaios utilizando discos foliares de plantas transformadas com o inserto *Tnchi* e de plantas transformadas com o vetor pK7WG2D vazio (plantas controle) foram cortados e colocados em células (23 mm x 20 mm) de placas de cultivo, sobre papel de filtro recobrimdo uma camada de ágar a 2,5%. Uma lagarta de *H. virescens* com três dias de idade foi colocada sobre o disco foliar de cada célula e a sobrevivência (%) e peso (mg) das lagartas foram observados quatro dias após o início da alimentação. Foram avaliadas 21 lagartas em plantas transformadas com o inserto *Tnchi* e 16 lagartas em plantas controle. Cada lagarta constituiu uma repetição, sendo a sobrevivência e o ganho de peso avaliados pelo teste *t* ($P < 0,05$), utilizando o programa R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

6.2.1.8 Atividade de quitinase nas folhas de plantas transformadas com o inserto *Tnchi* e controle

Folhas jovens de plantas transformadas com o inserto *Tnchi* e de plantas controle foram coletadas, limpas em água corrente e secas em papel absorvente. As folhas foram cortadas em pequenos pedaços (aproximadamente 1 cm²), congeladas em N₂ líquido e maceradas com auxílio de almofariz e pistilo. O pó obtido foi transferido para tubo, no qual foi adicionado tampão de extração -50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH = 7,5 (DAWSON et al., 1989) acrescido de 1 mM polietilenoglicol (MW 8000), 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 8% polivinilpirrolidona (PVP) (MW 40.000), 0,01% Triton X-100- na proporção de 5 mL de tampão para cada grama de tecido foliar (1:5 p/v). O material foi homogeneizado por

1 h a 200 rpm a 4°C, centrifugado (16.000g x 10 min x 4°C) e o sobrenadante (extrato enzimático) coletado. As amostras foram mantidas em gelo para análise ou armazenadas a -20°C.

A atividade de quitinase de plantas transformadas com o inserto *Tnchi* e de plantas controle foi verificada por meio da detecção de 4-metilumbeliferona a partir da hidrólise do substrato metilumbeliferil- β -N',N',N'-triacetil-quitotriosídeo (MUC3) (BAKER; WOO, 1992). Em síntese, o ensaio consistiu da incubação de 15 μ L do extrato enzimático das folhas com 10 μ L do tampão 200 mM Tris-maleato (pH = 7,5) (DAWSON et al., 1989) e 5 μ L do substrato 0,6 mM MUC3 a 30°C. As reações foram interrompidas a intervalos de 30 min pela adição de 200 μ L de solução 800 mM glicina-hidróxido de amônio (pH = 10,5) (DAWSON et al., 1989), sendo as leituras feitas em espectrofotômetro com emissão de fluorescência a 450 nm e excitação a 360 nm.

6.2.2 Expressão heteróloga da proteína *Tnchi* em *E. coli*

A expressão da proteína *Tnchi* recombinante em *E. coli* (*Tnchi_rec*) seguiu o seguinte fluxograma: subclonagem do inserto *Tnchi* do vetor pENTR-D-TOPO para o vetor pDEST17, transformação de células de expressão *E. coli* BL21, avaliação da expressão da proteína, avaliação da solubilidade da proteína e solubilização da proteína. Os procedimentos adotados nessas etapas são descritos a seguir.

6.2.2.1 Subclonagem do inserto *Tnchi* para o vetor de expressão heteróloga pDEST17

A reação de recombinação para transferência do inserto *Tnchi* do vetor direcional pENTR-D-TOPO para o vetor pDEST17 utilizado no processo de expressão heteróloga em células de *E. coli* foi feita conforme descrito no item 6.2.1.1, diferindo apenas que o agente de seleção no caso do plasmídeo pDEST17 foi a ampicilina em concentração final de 100 mg/L. A confirmação da presença e integridade da informação do inserto *Tnchi* no plasmídeo pDEST17 foi feita da mesma maneira que descrito no item 6.2, mas utilizando-se o iniciador T7 em vez do iniciador M13F.

6.2.2.2 Avaliação da expressão da proteína *Tnchi_rec*

Os plasmídeos pDEST17+*Tnchi* foram inseridos em células de expressão heteróloga *E. coli* BL21 por meio de transformação química, seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen®), assim como descrito anteriormente. A expressão piloto para verificação da produção da proteína *Tnchi_rec* foi realizada a partir de um pré-inóculo de *E. coli* BL21 com pDEST 17+*Tnchi* feito em meio LB + ampicilina (100 mg/L) sob agitação constante (200 rpm) e cultivado a 37°C até atingir densidade ótica de 0,6 - 1,0 a 600 nm. Uma alíquota de 5 mL desse pré-inóculo foi adicionada a 95 mL de meio LB com ampicilina (100 mg/L), seguindo ao cultivo das células até densidade ótica de aproximadamente 0,4 a 600 nm (2 a 3 h de cultivo). O cultivo foi dividido em duas frações de 50 mL, sendo uma delas induzida a expressar para a proteína de interesse com L-arabinose (concentração final igual a 0,2%) e cultivo a 200 rpm e 37°C, retirando-se amostras de 500 µL de hora em hora até 4 h após a indução. As amostras foram centrifugadas (5.000g por 5 min), o sobrenadante descartado e as células armazenadas a -20°C até serem utilizadas. Cada sedimento celular foi ressuspensão em 80 µL de tampão SDS PAGE 1X (1% SDS, 12,5% glicerol, 2,5% β-mercaptoetanol, 0,005% azul de bromofenol, 31,25 mM Tris- HCl pH=6,8) e fervido durante 10 min. As proteínas das amostras foram separadas por eletroforese em voltagem constante de 100 V em gel de poliacrilamida a 7,5% no gel de resolução e 5% no gel de empacotamento (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As bandas das proteínas foram visualizadas utilizando o reagente Gel Code (Pierce), seguindo as recomendações do fabricante.

6.2.2.3 Teste para verificar a solubilidade da proteína *Tnchi_rec*

Para verificar a solubilidade da proteína *Tnchi_rec*, realizou-se um procedimento de indução de expressão da proteína semelhante ao descrito no item anterior, sendo as células cultivadas a 15°C sob agitação (200 rpm) após indução da expressão com arabinose 0,2%. Nas células mantidas em condições normais de expressão, a indução foi realizada com arabinose a 0,02%. Decorrido o tempo após indução da expressão (4 h para os cultivos a 37°C e 12 h para o cultivo a 15°C) com L-arabinose, amostras de 500µL foram coletadas, centrifugadas (10.000g x 25°C x 5 min), o sobrenadante foi descartado e 500 µL de tampão de lise 50 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, pH = 7,8 (DAWSON et al., 1989), acrescido de 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glicerol, 0,5% Triton X-100 e 10 mM imidazol, foram adicionados à

amostra. Após lise das células por três ciclos de congelamento em gelo seco mais metanol e descongelamento em banho-maria a 42°C, as amostras foram centrifugadas (18.000g x 4°C x 1 min) e a fração solúvel coletada no sobrenadante, enquanto a fração insolúvel ficou no sedimento. Ao sedimento foram adicionados 500 µL de tampão SDS PAGE 1x e a 10 µL do sobrenadante foram adicionados 10 µL de tampão SDS PAGE 2x (2% SDS, 25% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol, 62,5 mM Tris-HCl, pH = 6,8). As amostras foram fervidas durante 5 min e aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida a 7,5% , assim como descrito no item anterior.

6.2.2.4 Solubilização e renaturação da proteína *Tnchi_rec*

Um pré-inóculo de 5 mL de células de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pDest17+*Tnchi* foi cultivado em meio LB com ampicilina (100 mg/L) durante 16 h a 37°C, sob agitação constante (200 rpm). Esse pré-inóculo foi adicionado a 95 mL de meio LB com ampicilina 100 mg/mL, cultivado a 37°C sob agitação (200 rpm) por aproximadamente 2 h ($DO_{600} = 0,4$). Nesse ponto, a expressão da proteína *Tnchi_rec* foi induzida pela adição de L-arabinose (concentração final de 0,2%) e o cultivo foi mantido por mais 4 h nas mesmas condições. Ao término do período de cultivo com expressão induzida, as células foram separadas em duas alíquotas de 50 mL e sedimentadas via centrifugação (10.000g a 4°C por 10 min). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise 50 mM 50 mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , pH = 7,8 (DAWSON et al., 1989), acrescido de 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glicerol, 0,5% Triton X-100, 10 mM imidazol e lisozima na concentração final de 0,35 mg/mL. O rompimento completo das células foi obtido via ciclos (3x) alternados de congelamento (em uma mistura de gelo seco e metanol) e descongelamento (em banho-maria a 42°C), seguidos de sonicação (10 s). Após a lise, os restos celulares e a fração proteica insolúvel (corpos de inclusão) foram sedimentados por centrifugação (20.000g a 4°C por 30 min). O sedimento foi ressuspenso em 50 mL de água Milli-Q e novamente centrifugado, antes de ser submetido a banho em 5 mL de tampão de lavagem dos restos celulares 10 mM Tris-HCl, pH=7,5 (DAWSON et al., 1989), acrescido de 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 e 1 M uréia. As amostras foram incubadas nesse tampão por 5 min à temperatura ambiente e novamente centrifugadas (20.000g a 4°C por 30 min) para coleta do sedimento. O sedimento (corpos de inclusão) foi então ressuspenso em 1 mL de tampão de solubilização 500 mM Tris-HCl, pH=10,0 (DAWSON et al., 1989), acrescido de

50 mM MgCl₂, 25 mM β-mercaptoetanol, 1% Tween-20 e 8 M uréia, incubado a 4°C por 1 h e submetido a nova centrifugação (20.000g a 4°C por 30 min) para recuperação do sobrenadante.

As amostras foram dialisadas em membrana de celulose com poros de 12 kDa (Sigma®) em um volume de água de 2 L a 4°C sob agitação, pelo período de 1 h, sendo realizadas cinco trocas sucessivas. Após a diálise, a concentração de proteínas das amostras foi determinada por meio de teste colorimétrico baseado no método de Bradford (1976), utilizando o reagente comercial Commaassie Brilliant Blue G-250 (Pierce®), seguindo as recomendações do fabricante. A fração solúvel foi utilizada para a verificação do padrão proteico via eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 7,5% (SDS-PAGE), nas mesmas condições descritas no item 6.2.2.2. A solubilização da *Tnchi_rec* em tampão de solubilização com pH = 7,5 e uréia a 8 M também foi testada, sendo o ensaio conduzido de forma semelhante àquela descrita anteriormente.

6.2.2.5 Ensaio de atividade quitinolítica da proteína *Tnchi_rec*

A proteína *Tnchi_rec* teve seu potencial quitinolítico avaliado em três substratos diferentes, i) *p*-nitrofenil-N-acetil-β-glicosaminídeo, ii) quitina coloidal e iii) quitina Azure (Sigma®). Inicialmente, verificou-se a atividade de quitinase por meio da detecção de *p*-nitrofenol (TERRA; FERREIRA; De BIANCHI, 1979 com alterações) a partir da hidrólise do substrato *p*-nitrofenil-N-acetil-β-glicosaminídeo, utilizando-se de 500 μL de 50 mM NaOH para interromper a reação ao invés da solução originalmente proposta pelos autores. A reação de hidrólise foi obtida incubando-se 50 μL da proteína recombinante (0,85 mg/mL) com 50 μL do substrato (10 mM) preparado em 100 mM tampão ácido cítrico- Na₂HPO₄, pH = 6,0 (DAWSON et al., 1989). A reação foi interrompida em intervalos de 30 min. Após a interrupção, as amostras foram avaliadas via espectrofotometria em comprimento de onda de 400 nm.

Para a determinação da atividade de quitinase sobre quitina coloidal, preparou-se o substrato após modificações no método de Ramírez et al. (2004), com algumas modificações, por meio de incubação de quitina (Sigma) com ácido fosfórico (85% p/v) por 24 h a 4°C, na proporção de 10 g/100mL, em constante agitação, por 2 h. Após incubação, a quitina mais o ácido fosfórico foram transferidos para recipiente contendo 2 L de água e a solução formada

foi exaustivamente lavada com água destilada por meio de centrifugação (10.000g x 25°C x 10min), até que a solução apresentasse pH neutro (pH = 7,0). O volume final da solução foi acertado de modo que a quitina coloidal preparada estivesse na concentração de 15 mg/mL. Para determinação da atividade de quitinase sobre quitina coloidal, 100 µL da proteína *Tnchi_rec* (0,85 mg/mL) foram incubados com 50 µL de quitina coloidal (15 mg/mL) e 50 µL de tampão Tris-maleato (200 mM, pH = 7,5) (DAWSON et al., 1989). A intervalos de 30 min, 200 µL do reagente DNS foram adicionados às amostras para quantificação dos grupos redutores formados (NOELTING; BERNFELD, 1948), após fervura (5 min) e adição de 1600 µL de água, centrifugação (10.000g x 25°C x 10 min), transferência do sobrenadante para cubetas e leitura das amostras em espectrofotômetro a 550 nm.

A atividade da proteína *Tnchi_rec* sobre o substrato quitina Azure foi realizada após transformação do substrato para sua forma coloidal, assim como descrito no item 6.2.1.8. A reação de hidrólise contou com 100 µL da proteína recombinante (0,85 mg/mL), 400 µL do substrato quitina Azure a 0,5% (p/v) em 100 mM tampão ácido cítrico- Na_2HPO_4 , pH = 6,0 (DAWSON et al., 1989). A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de 2 M HCl em intervalos de 1 h, as amostras centrifugadas (10.000g por 5 min) e a absorbância do sobrenadante a 560 nm avaliada em espectrofotômetro.

Todos os substratos avaliados foram incubados a 30°C e os ensaios foram conduzidos de forma cinética e descontínua com pelo menos quatro períodos de incubação. As proteínas totais das amostras foram detectadas segundo método proposto por Bradford (1976), utilizando o reagente comercial Commassie Brilliant Blue G-250 (Pierce®), seguindo as recomendações do fabricante.

A procura por atividade quitinolítica da proteína *Tnchi_rec* em diferentes pHs foi verificada por meio de incubação dos substratos quitina coloidal e quitina coloidal Azure em ensaios conduzidos da mesma maneira descrita acima, a não ser pela preparação dos substratos em uma ampla faixa de pH, utilizando os tampões ácido cítrico- Na_2HPO_4 (pH 4,0 a 7,0), Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 7,0 a 8,0), Tris (hidroximetil) aminometano-HCl (pH 8,0 a 8,9), glicina-NaOH (pH 8,9 a 10,5) (DAWSON et al., 1989), com período único de hidrólise de 4 h.

6.2.2.6 Ensaio de atividade lisozimática da proteína *Tnchi_rec*

A atividade lisozimática da proteína *Tnchi_rec* foi determinada incubando-se 125 µL de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeictkus* (Sigma[®]) preparadas a 4 mg/mL, 312,5 µL de 200 mM tampão ácido cítrico- Na_2HPO_4 pH = 6,0 (DAWSON et al., 1989) com 62,5 µL de suspensão da proteína *Tnchi_rec* (350 µg/mL). A detecção da atividade foi feita acompanhando-se a diminuição dos valores de absorbância a 450 nm em intervalos de 1 min em reações de 10 min a temperatura ambiente.

6.2.2.7 Ensaio de ligação da proteína *Tnchi_rec* a diferentes políssacarídeos

A capacidade de ligação da proteína *Tnchi_rec* foi verificada utilizando quitina coloidal, quitina cristalina, quitina cristalina lavada, células de *M. lysodeictkus* lavadas e xilana lavada. A lavagem (3x) dos polímeros foi feita pela incubação de 10 mg do polímero a ser testado em 14 mL de água, agitação vigorosa e centrifugação (10.000g a 4°C por 10 min) para coleta e ressuspensão do sedimento em 500 µL de água ou tampão. O ensaio de ligação da proteína aos polímeros foi baseado em Ghasemi et al. (2011) e explorou a propriedade desses polímeros em sedimentar quando submetidos à centrifugação (10.000g a 4°C por 10 min). Uma quantidade padrão de proteína recombinante (50 µg) foi colocada em contato com 10 mg de cada um dos polímeros avaliados e incubada a 4°C por 1 h, sendo a mistura homogeneizada via inversão do recipiente a cada 10 min. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (10.000g a 4°C por 10 min) e a quantidade de proteína em suspensão determinada utilizando o reagente comercial Commassie Brilliant Blue G-250 (Pierce[®]), seguindo as recomendações do fabricante. O controle da reação de ligação consistiu da incubação da proteína *Tnchi_rec* com água e sem quitina, assim como descrito anteriormente. A quantidade da proteína recombinante adsorvida ao polímero foi determinada pela subtração da quantidade total de proteína inicialmente adicionada à suspensão do polímero da quantidade de proteína detectada em suspensão ao término do período de incubação. A propriedade da proteína *Tnchi_rec* se ligar à quitina em diferentes pHs foi conduzida da mesma maneira, sendo, porém, a proteína *Tnchi_rec* incubada com quitina coloidal preparada nos tampões 200 mM ácido cítrico-citrato de sódio (pH 5,08 e 5,58) e 200 mM Tris (hidroximetil) aminometano-maleato (pH 6,08 a 8,60) (DAWSON et al., 1989).

A estabilidade térmica da proteína *Tnchi_rec* foi verificada após fervura por 5 min da proteína e ensaio de ligação em quitina coloidal preparada em solução aquosa, assim como descrito anteriormente.

6.2.2.8 Atividade antimicrobiana da proteína *Tnchi_rec*

O efeito da proteína *Tnchi_rec* sobre o desenvolvimento microbiano foi verificado por meio de ensaio utilizando um inóculo da bactéria *E. coli* preparado em cultivo em meio LB a 37°C e agitação constante (200 rpm) por 16 h. O inóculo obtido foi diluído em meio LB para obtenção de absorbância aproximada de 0,009 a 600 nm. O inóculo diluído foi incubado a 37°C, sob agitação (200 rpm), com a proteína *Tnchi_rec* (concentração final de 100 µg/mL) filtroesterilizada (0,22µm). O crescimento bacteriano foi determinado via leitura da absorbância do meio de cultura a 600 nm a intervalos de meia hora. O controle consistiu da incubação do mesmo inóculo diluído com volume de água filtroesterilizada equivalente ao volume da suspensão de proteína adicionado ao ensaio. Foram realizadas 5 repetições de cada tratamento. Ensaio para avaliar o efeito de diferentes doses foram conduzidos como descrito anteriormente, porém com as doses de 0, 50, 100 e 200 µg de proteína *Tnchi_rec* por mL de meio de cultivo.

6.2.2.9 Atividade inseticida da proteína *Tnchi_rec* a lagartas *Heliothis virescens*

A atividade inseticida da proteína recombinante *Tnchi_rec* foi testada via incorporação da mesma à dieta artificial utilizada na criação de lagartas de *H. virescens* (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976). A dieta foi preparada seguindo Parra (1999) e mantida a 50°C para a incorporação e homogeneização da proteína recombinante à dieta para uma concentração final de 100 µg proteína recombinante/mL de dieta. A dieta foi então transferida para tubos de vidro (23 mm de diâmetro x 80 mm de altura) para solidificação e inoculação com lagartas neonatas de *H. virescens* (0-24 h de idade). Foi inoculada uma lagarta por tubo, com 19 lagartas no tratamento controle e 16 lagartas no tratamento teste, sendo cada lagarta uma repetição. Após a inoculação, os tubos foram fechados com algodão hidrófugo e transferidos para ambiente com condições controladas (28±1°C, 60±10% UR, fotofase de 14 h) para o desenvolvimento do inseto. O controle foi feito da mesma maneira que o tratamento com *Tnchi_rec*, porém, em vez de solução contendo a proteína teste, adicionou-se volume equivalente de água. O desenvolvimento das lagartas foi acompanhado

até a fase de pupa, sendo a sobrevivência e o tempo de desenvolvimento larval e o peso das pupas (24 h de idade) avaliados para se verificar o efeito nocivo da quitinase recombinante no desenvolvimento de *H. virescens*. Os dados obtidos foram comparados pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$), utilizando o programa R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

6.3 Resultados

6.3.1 Transformação de plantas de fumo

Dez calos independentes foram obtidos, enraizados e transferidos para vasos. Essas plantas foram numeradas T₀1 a T₀10 e foram cultivadas em casa de vegetação. A inserção do transcrito *Tnchi* no genoma das plantas transformadas foi verificada por meio de reação de PCR gene-específico com os iniciadores GATEF e GATER e foi observada a presença do transgene nas 10 plantas obtidas (Figura 6.1).

Figura 6.1 - Reação de PCR gene-específico com os iniciadores GateF e GateR indicando a presença do inserto *Tnchi* nas plantas de fumo transformadas (1-10) e ausência no DNA da planta transformada controle (11); M: marcador 1kb (Invitrogen)

O teste de crescimento das sementes obtidas das plantas T₀ em meio de germinação MS contendo canamicina (50 mg/L) indicou que cinco plantas T₁ (T₁2, T₁5, T₁8, T₁9 e T₁10) apresentaram perfil de segregação 3:1 para a resistência a canamicina. A reação de PCR feita a partir do cDNA das plantas T₀ com padrão de segregação 3:1 para o teste de crescimento em meio contendo canamicina (50 mg/L) confirmou a transcrição do transgene *Tnchi* nas plantas transformadas (Figura 6.2).

Os testes de segregação das plantas T₂ permitiram a identificação de quatro plantas (T₂2III, T₂8IV, T₂9II e T₂10II) com padrão de segregação esperado, confirmando a

homozigossidade para o caráter de resistência (canamicina – 50 mg/L) e, conseqüentemente, para o gene da proteína *Tnchi*.

Figura 6.2 - Reação de RT-PCR gene-específica com os iniciadores GateF e GateR indicando a transcrição do inserto *TnChi* nas plantas T_0 com segregação 3:1 para resistência a canamicina (50 mg/L) (M: marcador 100 pb - Amresco; 1: Planta controle; 2: Planta T_{02} ; 3: Planta T_{05} ; 4: Planta T_{08} ; 5: Planta T_{09} ; 6: Planta T_{010})

Ensaio biológico com plantas T_1 não resultaram em efeitos sobre o desenvolvimento de lagartas *H. virescens*, visto que o ganho de peso de lagartas após 4 d de alimentação em plantas transformadas com o inserto *Tnchi* ($10,8 \pm 1,3$ mg; $n=21$) foi similar àquele de lagartas mantidas em plantas controle ($7,4 \pm 1,6$ mg; $n=16$) ($P = 0,1146$, pelo teste *t*). Não foi observada mortalidade de nenhuma lagarta nas duas condições avaliadas.

A atividade quitinolítica do extrato proteico de folhas das plantas transformadas T_1 com o inserto *Tnchi* ($586,74 \pm 156,56$ nmol/min/mg proteína) não diferiu daquela observada nas plantas controle ($543,87 \pm 146,45$ nmol/min/mg proteína), tendo como substrato o MUC3.

6.3.2 Expressão heteróloga da proteína *Tnchi* em *E. coli*

A expressão da proteína *Tnchi* em sistema heterólogo (*Tnchi_rec*) foi concluída com sucesso, sendo detectada 2 h após a indução da expressão com L-arabinose 0,2%. A proteína recombinante superexpressa detectada no gel possui peso molecular condizente com o peso molecular esperado da proteína *Tnchi*, de cerca de 54 kDa (Figura 6.3)

Figura 6.3 - Perfil protéico das células de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pDEST17+*Tnchi* separados em SDS-PAGE a 7,5% [M: Marcador de peso molecular BioRad Broad Range; 1: Cultivo não-induzido 0 h; 2: Cultivo 0 h após indução da expressão (aie); 3: Cultivo não-induzido 1,5 h; 4: Cultivo 1,5 h aie; 5: Cultivo não-induzido 3 h; 6: Cultivo 3 h aie; 7: Cultivo não-induzido 4 h; 8: Cultivo 4 h aie]

A proteína *Tnchi_rec* foi produzida em grande quantidade, mas quase que exclusivamente na forma de corpos de inclusão, assim como verificado pela análise das frações solúvel e insolúvel do produto de expressão heteróloga obtido (Figura 6.4). Alterações nas condições de expressão da proteína *Tnchi_rec*, como indução da expressão a 15°C e redução da concentração final do agente indutor da expressão (arabinose), não evitaram a produção da proteína recombinante desejada na forma de corpos de inclusão.

Figura 6.4 - Perfil protéico do cultivo de *E. coli* BL 21+*Tnchi* 4 h após indução da expressão com 0,2% L-arabinose [M: Marcador de peso molecular BioRad Broad Range (kDa); 1: Extrato bruto (frações solúvel e insolúvel); 2: Extrato bruto controle; 3: Fração insolúvel; 4: Fração insolúvel controle; 5: Fração solúvel; 6: Fração solúvel controle]. Seta indica proteína *Tnchi_rec*

O processo de solubilização da proteína *Tnchi_rec* expressa na forma de corpos de inclusão pela bactéria *E. coli* BL21 (Figura 6.4; canaleta 3) não foi eficaz em 8 M uréia, pH = 7,5. A solubilização da proteína *Tnchi_rec* só foi obtida em tampão de solubilização em 8 M uréia, pH = 10,0 (Figura 6.5).

Figura 6.5 - Solubilização dos corpos de inclusão em diferentes condições de pH [M: Marcador de peso molecular Biorad Broad Range (kDa); 1: Fração insolúvel e 2: Fração solúvel após solubilização em 8 M uréia, pH=7,5; 3: Fração insolúvel e 4: Fração solúvel após processo de solubilização em 8 M uréia, pH = 10,0]

O bioensaio para avaliar o potencial inseticida da proteína *Tnchi_rec* indicou que o desenvolvimento de lagartas *H. virescens* e a transformação em pupas não sofreu interferência pela inclusão dessa proteína no alimento utilizado pelo inseto. Lagartas criadas em dieta contendo a quitinase recombinante apresentaram período de desenvolvimento larval ($21,2 \pm 0,63$ d; $n = 12$) semelhante àquele de lagartas criadas na dieta controle ($21,7 \pm 0,25$ d, $n = 15$) ($P = 0,2782$, teste t). O peso médio de pupas (24 h de idade) obtidas de dieta artificial acrescida de $100 \mu\text{g}$ *Tnchi_rec*/mL de dieta ($250,4 \pm 29,0$ mg; $n = 12$) também foi similar ao peso de pupas obtidas na dieta controle ($278,9 \pm 12,0$ mg; $n = 15$) ($P = 0,4057$, teste t). A mortalidade observada no tratamento teste (4 lagartas em 16) não diferiu da mortalidade observada no controle (4 lagartas em 19), segundo teste de χ^2 (χ^2 calculado = 0,0229; χ^2 tabelado = 3,84; grau de liberdade = 1; $P < 0,05$).

A proteína *Tnchi_rec* não apresentou qualquer capacidade quitinolítica sobre os substratos quitina Azure coloidal, quitina coloidal e *p*-nitrofenil-N-acetil- β -glicosaminídeo nas condições avaliadas. A proteína *Tnchi_rec* também não apresentou capacidade de hidrólise do substrato composto por células liofilizadas de *M. lysodeictkus*, não sendo possível, portanto, atribuir a esta proteína recombinante a função de lisozima.

Os ensaios de ligação da proteína *Tnchi_rec* aos substratos avaliados indicou a capacidade dessa proteína em se ligar à quitina coloidal e à quitina cristalina lavada, ambas

em solução aquosa. Quando a quitina coloidal foi preparada em solução aquosa, $92,17 \pm 1,62\%$ da proteína *Tnchi_rec* sedimentou junto com o substrato. Após fervura, a proteína *Tnchi_rec* manteve sua capacidade de ligação à quitina coloidal preparada em água, sendo detectada sedimentação de $89,37 \pm 0,93\%$ do total de proteína colocada em suspensão, juntamente com o polímero. Quando avaliada a capacidade de ligação da proteína *Tnchi_rec* à quitina cristalina lavada, observou-se ligação próxima a $58,34 \pm 0,82\%$. No entanto, a proteína *Tnchi_rec* não apresentou capacidade de ligação à xilana, células de *M. lysodeictkus* (Gram positiva) e quitina cristalina não-lavada preparadas em água.

O ensaio de ligação da proteína *Tnchi* à quitina coloidal preparada em diferentes pHs indicou que a proteína avaliada sedimenta espontaneamente na faixa de pH entre 3,82 e 6,50, faixa de pH próxima ao seu ponto isoelétrico predito, $pI = 5,5$ (CÔNSOLI et al., 2007), impedindo, dessa forma, de se determinar se a proteína sedimentada em solução contendo o polímero testado ocorreu em função do pH ou em função de sua ligação ao polímero. Em valores de pH abaixo de 3,82, a proteína não sedimentou em função do pH e parte da proteína recombinante sedimentou junto com o polímero, sendo observadas sedimentações de aproximadamente 30% da proteína nos pHs 2,63 e 3,17. Em valores de pH superiores a 6,74, não houve sedimentação em função do pH e a ligação da proteína *TnChi_rec* à quitina pode ser definida, sendo observada sedimentação aproximada de 80% da proteína recombinante, juntamente com a quitina em $pH = 6,74$ e de aproximadamente 40% em $pH = 7,23$. Porém, em valores de pH superiores a 7,23, índices de sedimentação inferiores a 15% foram detectados, indicando que a proteína *Tnchi_rec* se liga com baixa eficiência à quitina em condições alcalinas (Figura 6.6).

Figura 6.6 - Quantidade (%) de proteína *Tnchi_rec* sedimentada após incubação de 50 μ g de proteína a 4°C por 1 h com 10 mg de quitina coloidal preparada em diferentes pHs

Apesar da proteína *Tnchi_rec* não ter demonstrado atividade lisozimática, a inclusão da mesma em meio de cultivo de *E. coli* reduziu substancialmente o crescimento dessa bactéria Gram negativa no período máximo observado (120 h), sendo a absorbância do meio contendo a proteína recombinante cerca de 4 vezes inferior àquela obtida no meio controle (Figura 6.6).

Figura 6.7 - Multiplicação de células de *E. coli* mantidas em meio LB líquido acrescido da proteína *Tnchi* recombinante (100 μ g/mL) (◇) ou não (□). Cultivo a 37°C sob agitação constante (200 rpm)

Ensaios para se avaliar o efeito de diferentes concentrações da proteína recombinante no crescimento de células de *E. coli* (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), indicaram que a proteína *Tnchi_rec* inibiu o crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas. O efeito de inibição do crescimento bacteriano pode ser melhor observado após 180 min de cultivo, quando a diferença de absorbância do meio controle em relação aos meios com a proteína recombinante é maior (inibição de aproximadamente 3x). A inibição do crescimento bacteriano foi maior quanto maior a concentração da proteína recombinante, passando de 20% de inibição na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para 40% nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, sem haver, porém, diferença entre as duas concentrações maiores (Figura 6.8).

Figura 6.8 - Curva de crescimento de células de *E. coli* em meio LB incubado a 37°C e 200 rpm com diferentes concentrações da proteína *Tnchi_rec* adicionada ao meio de cultivo. ◇: 0 $\mu\text{g/mL}$ (controle), □: 50 $\mu\text{g/mL}$, △: 100 $\mu\text{g/mL}$, ○: 200 $\mu\text{g/mL}$

6.4 Discussão

A quitinase predita a partir da tradução de um cDNA isolado de teratócitos de *T. nigriceps* possui aminoácidos-chave do sítio catalítico posicionados corretamente, conforme as glicosil-hidrolases funcionais da família 18 (DXXDXDXE) (WATANABE et al., 1994), mas a proteína recombinante (*Tnchi_rec*) obtida nos dois sistemas de expressão heteróloga empregados (plantas de fumo e *E. coli*) não apresentou atividade quitinolítica sobre os substratos avaliados. Porém, a *Tnchi_rec* obtida da expressão em células de *E. coli* apresentou capacidade comprovada de ligação à quitina coloidal e quitina cristalina lavada, sendo essa propriedade dependente do pH e com ponto ótimo de ligação em solução aquosa não tamponada e em pH = 6,74, valor próximo àquele encontrado na hemolinfa da maioria das

lagartas de Lepidoptera, como *H. virescens* (MULLINS, 1985), hospedeiro do parasitoide *T. nigriceps*, local onde a proteína avaliada é secretada (CÔNSOLI et al., 2005).

Por não apresentar atividade quitinolítica e por possuir capacidade de ligação à quitina coloidal e à quitina cristalina lavada, a proteína *Tnchi* pode ser reclassificada como uma quitolectina, ou seja, uma proteína sem capacidade hidrolítica sobre quitina, mas com a propriedade de se ligar a esse polímero. Análises recentes da *Tnchi* junto aos bancos de dados permitiu a identificação de região domínio representativa das proteínas do grupo das quitolectinas-quitotriosidases (evalue = $0e^{+00}$), as quais podem ou não apresentar atividade hidrolítica sobre quitina, mas que possuem capacidade de ligação a açúcares.

Proteínas do tipo lectina são conhecidas por sua capacidade de ligação a resíduos de açúcares (RAMOS et al., 1999) e podem apresentar atividade antimicrobiana por interagirem com resíduos de açúcares presentes na superfície externa da parede celular de microrganismos (BORMANN et al., 1999; BROEKAERT et al., 1989; GUAN; CHYE, 2008). Como não foi detectada atividade lisozimática pela proteína *Tnchi*, propriedade hidrolítica testada devido a existência de quitinases bifuncionais que se comportam como lisozimas (GHASEMI et al., 2011; WANG; CHANG, 1997), sugere-se que a atividade antimicrobiana dessa proteína seja em função da capacidade de ligação da proteína a resíduos de açúcares e funcione como um tipo de “anticorpo” generalista que atue contra diversos microrganismos. Além disso, o fato da proteína *Tnchi* não se ligar à quitina cristalina não-lavada indica que os açúcares com cadeia menor e solúveis, tais como os presentes na parede celular de microrganismos, são capazes de se ligar aos sítios de ligação da proteína *Tnchi*.

Algumas proteínas do tipo lectina possuem atividade inseticida (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002) por se ligarem aos açúcares das glicoproteínas presentes na membrana peritrófica e na superfície do epitélio do intestino ou em glicoproteínas do lúmen do trato digestivo de lagartas, causando danos ao desenvolvimento do herbívoro (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011). Porém, a proteína *Tnchi*, agora considerada uma quitolectina, não apresentou atividade inseticida quando expressa em sistema heterólogo e adicionada em dieta artificial, ou quando expressa em plantas transgênicas de fumo. De forma semelhante, Sétamou et al. (2002) também não verificaram atividade inseticida da lectina de *Galanthus nivalis* sobre o desenvolvimento de lagartas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). A ausência de atividade inseticida da proteína recombinante pode ser explicada pela incapacidade de ligação da proteína *Tnchi_rec* à quitina em pHs alcalinos, assim como demonstrado, já que o pH no lúmen intestinal de Lepidoptera é reconhecidamente alcalino (KARUMBIAH et al., 2007; TERRA;

FERREIRA, 1994). Outro fator que poderia estar influenciando a capacidade inseticida dessa proteína seria sua suscetibilidade às proteases digestivas do herbívoro, assim como observado para outras proteínas com potencial inseticida, como, por exemplo, o fator oostático modulador da tripsina (TMOF) (FITCHES et al., 2004; JEFFERS et al., 2012).

A ausência de atividade quitinolítica da proteína *Tnchi_rec* nos remete à sua função biológica em seu local natural de expressão. Por ser uma proteína expressa nos teratócitos do parasitoide *T. nigriceps* em desenvolvimento e ser detectada apenas em momentos próximos à saída das larvas do parasitoide do interior de seu hospedeiro, em um primeiro momento, atribuiu-se a essa proteína as funções de auxiliar i) a saída do parasitoide por meio de digestão do tegumento do hospedeiro ou ii) o sistema imunológico debilitado pelos efeitos imunossupressores do parasitoide contra infecções microbianas na hemocele de seu hospedeiro (CÔNSOLI et al., 2007). Em função de não ter sido observada função quitinolítica e ter sido detectada atividade antimicrobiana da proteína *Tnchi_rec*, aparentemente a função dessa proteína está relacionada com a manutenção da assepsia do ambiente no qual o parasitoide se desenvolve. Como o tegumento e os tecidos de origem ectodérmica do trato digestivo do parasitoide também são compostos por quitina (KLOWDEN, 2008), o parasitoide poderia sofrer com a ação das quitinases secretadas por ele mesmo. Reforçando a capacidade de manutenção da assepsia do ambiente de desenvolvimento do parasitoide pelos teratócitos, Fuhrer e Elsufty (1979) também diagnosticaram a presença de um fator com ação fungistática derivado de teratócitos de *Cotesia glomerata* (L.) (Hymenoptera: Braconidae). Porém, dada a sua capacidade de atuar como lectina, também existe a possibilidade de que a *Tnchi* possa estar envolvida no transporte de proteínas intactas do hospedeiro pelo epitélio digestivo do parasitoide. Apesar da absorção de moléculas protéicas inteiras, sem processamento digestivo, ser relatada em insetos, o mecanismo de absorção ainda é desconhecido (CASARTELLI et al., 2005; HABIBI et al., 2002; JEFFERS; ROE, 2008; JEFFERS et al., 2005). Porém, tem sido sugerido que um dos mecanismos que permitiriam esse transporte seria a fusão de proteínas com lectinas (JEFFERS; ROE, 2008), assim como tem sido demonstrado pela utilização de lectinas como transportadoras de proteínas tóxicas pelo trato digestivo de insetos (FITCHES et al., 2008).

Em função do efeito antimicrobiano detectado, de sua estabilidade térmica e de sua atividade de lectina, novos ensaios para explorar as propriedades biotecnológicas dessa proteína devem ser realizados. O potencial de atividade antimicrobiana demonstrado e o fato de que proteínas com domínio ligante de quitina são eficazes no controle do desenvolvimento de microrganismos (BORMANN et al., 1999), permitiria a exploração de *Tnchi* para a

transformação de plantas voltada ao controle de fitopatógenos, à semelhança do obtido com quitinase de uma nucleopoliedrose (DI MARO et al., 2010). Além disso, mesmo não apresentando atividade inseticida sobre lagartas de *H. virescens*, que apresentam pH intestinal extremamente alcalino (KARUMBALIAH et al., 2007), insetos com pH intestinal ácido, como os sugadores da ordem Hemiptera (TERRA; FERREIRA, 1994), podem ser suscetíveis à proteína *Tnchi* dada à atividade de lectina demonstrada por esta proteína, visto o demonstrado potencial inseticida de lectinas contra hemípteros (BANDYOPADHYAY; ROY; DAS, 2001). Ainda, a atividade de lectina da *Tnchi* poderia ser explorada para conjugação com outras moléculas tóxicas com atividade na hemocele do inseto e que necessitariam ser transportadas intactas pelo epitélio do trato digestivo de insetos.

No presente trabalho foi realizada a caracterização de uma proteína derivada dos teratócitos de *C. flavipes* e sua ação inseticida sobre lagartas de *H. virescens* e antimicrobiana sobre *E. coli* foram avaliadas, tornando possível realizar inferências a respeito das funções biológicas exercidas por essa proteína em seu sistema natural de ocorrência e sobre novas possibilidades de utilização dessa proteína no combate a pragas.

6.5 Conclusões

- a quitinase recombinante de teratócitos de *Toxoneuron nigriceps* não apresenta atividade quitinolítica detectável;
- a quitinase recombinante de teratócitos de *T. nigriceps* não apresenta atividade inseticida via ingestão em dieta artificial;
- a quitinase recombinante de teratócitos de *T. nigriceps* apresenta atividade antimicrobiana;
- a quitinase recombinante de teratócitos de *T. nigriceps* é capaz de se ligar à quitina coloidal e cristalina;
- a capacidade de ligação da quitinase recombinante de teratócitos de *T. nigriceps* à quitina coloidal é influenciada pelo pH;
- plantas transgênicas de fumo expressando a quitinase de teratócitos de *T. nigriceps* não afetam o desenvolvimento larval de *Heliothis virescens*.

Referências

ASGARI, S.; RIVERS, D.B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 56, p. 313-335, 2011.

BAKER, J.E.; WOO, S.M. β -glucosidases in the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: purification, properties and activity levels in wheat- and legume-feeding strains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 499-504, 1992.

BANDYOPADHYAY, S. ; ROY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 5, p. 1025-1033, 2001

BECKAGE, N.E. Parasitoids and polydnaviruses. **BioScience**, Washington, v. 48, n. 4, p. 305-311, 1998.

BECKAGE, N.E.; GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.49, p.299-330, 2004.

BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R.K. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 27, n. 1, p. 21-28, 2007.

BORMANN, C.; BAIER, D.; HÖRR, I.; RAPS, C.; ERGER, J.; JUNG, G.; SCHWARZ, H. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 24, p. 7421-7429, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, W.F.; VAN PARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W.J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, New York, v. 245, n. 4922, p. 1100-1102, 1989.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. a review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, Elmsford, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CASARTELLI, M.; CORTI, P.; LEONARDI, M.G.; FIANDRA, L.; BURLINI, N.; PENNACCHIO, F.; GIORDANA, B. Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 933-940, 2005.

CÔNSOLI, L.F.; BRANDT, S.L.; COUDRON, T.A.; VINSON, S.B. Host regulation and release of parasitism specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps*-*Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, Oxford, v.142B, n. 2, p. 181-191, 2005.

CÔNSOLI, F.L.; LEWIS, D.; KEELEY, K; VINSON, S.B. Characterization of a cDNA encoding a putative chitinase from teratocytes of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 122, n. 3, p. 271-278, 2007.

DAHLMAN, D.L. Evaluation of teratocyte functions: an overview. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3/4, p. 159-166, 1990.

DANNEELS, E.L.; RIVERS, D.B.; DE GRAAF, D.C. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: Recent discovery of an untapped pharmacopee. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 494-516, 2010.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. (Ed.). **Data for biochemical research**. New York: Oxford University Press, 1989. 580 p.

DI MARO, A.; TERRACCIANO, I.; STICCO, L.;FIANDRA, L.; RUOCCO, M.; CORRADO, G.; PARENTE, A.; RAO, R. Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 1-6, 2010.

FALABELLA, P.; TREMBLAY, E.; PENNACCHIO, F. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 1-9, 2000.

FATH-GOODIN, A.; GILL, T.A.; MARTIN, S.B.; WEBB, B.A. Effect of *Campoplex sonorensis* ichnovirus cys-motif proteins on *Heliothis virescens* larval development. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 52, n. 6, p. 576-585, 2006a.

FATH-GOODIN, A.; KROEMER, J.; MARTIN, S.; REEVES, K.; WEBB, B.A. Polydnavirus genes that enhance the Baculovirus expression vector system. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 68, p. 75-90, 2006b.

FEDDERSEN, I.; SANDER, K; SCHMIDT, O. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. **Experientia**, Basel, v. 42, n. 11/12, p. 1278-1281, 1986.

FITCHES, E.; PHILIP, J.; HINCHLIFFE, G.; VERCROYSSSE, L.; CHOUGULE, N.; GATEHOUSE, J.A. An evaluation of garlic lectin as an alternative carrier domain for insecticidal fusion proteins. **Insect Science**, v. 15, n. 6, p. 483-495, 2008.

FUHRER, E.; ELSUFTY, R. Produktion fungistatischer Metabolite durch Teratocyten von *Apanteles glomeratus* L. (Hym., Braconidae). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 21-25, 1979.

FUEHRER, E., WILLERS, D. The anal secretion of the endoparasitic larva *Pimpla turionellae*: sites of production and effects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 361-367, 1986.

GHASEMI, S.; AHMADIAN, G.; SADEGHI, M.; ZEIGLER, D.R.; RAHIMIAN, H.; GHANDILI, S.; NAGHIBZADEH, N.; DEHESTANI, A. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 48, n. 3, p. 225–231, 2011.

GILL, T.A.; FATH-GOODIN, A.; MAITI, I.I.; WEBB, B.A. Potential uses of cys-motif and polydnavirus genes in biotechnology. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 68, p. 393-426, 2006.

GLATZ, R.V.; ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 12, p. 545-554, 2004.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lahan, v. 69, n. 4, n. 487-488, 1976.

GUAN, Y.; CHYE, M. A *Brassica juncea* chitinase with two-chitin binding domains show anti-microbial properties against phytopathogens and Gram-negative bacteria. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 3, n. 12, p. 1103-1105, 2008.

HABIBI, J.; BRANDT, S.L.; COUDRON, T.A.; WAGNER, R.M.; WRIGHT, M.K.; BACKUS, E.A.; HUESING, J.E. Uptake, flow, and digestion of casein and green fluorescent protein in the digestive system of *Lygus hesperus* Knight. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 50, n. 2, p. 62-74, 2002.

HOCHULI, A.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B., Analysis of endoparasitoid-released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae) *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.45, n. 9, p. 823-833,1999.

JEFFERS, L.A.; ROE, R.M. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 319-332, 2008.

JEFFERS, L.A.; THOMPSON, D.M.; BEN-YAKIR, D.; ROE, R.M. Movement of proteins across the digestive system of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 117, n. 2, p. 135-146, 2005.

JEFFERS, L.A.; SHEN, H.; KHALIL, S.; BISSINGER, B.W.; BRANDT, A.; GUNNOE, T.B.; ROE, R.M. Enhanced activity of an insecticidal protein, trypsin modulating oostatic factor (TMOF), through conjugation with aliphatic polyethylene glycol. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, n. 1, p. 49-59, 2012.

KAESLIN, M.; REINHARD, M.; BÜHLER, D.; ROTH, T.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* is a complex mixture and has multiple biological effects. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 696-694, 2010.

KARUMBIAIAH, L.; OPPERT, B.; JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and-resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 146, n. 1, p. 139–146, 2007.

KLOWDEN, M.J. Developmental systems. In: _____. **Physiological systems in insects**. New York: Academic Press, 2008. chap. 3, p. 137-179.

KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 887-900, 1997.

LAVINE, M.D.; BECKAGE, N.E. Polydnviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 368-378, 1995.

MAITI, I.B.; DEY, N.; PATTANAIK, S.; DAHLMAN, D.L.; RANA, R.L.; WEBB, B.A. Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 209-219, 2003.

MOREAU, S.J.M.; GUILLOT, S. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1209-1223, 2005.

MULLINS, D.E. Chemistry and physiology of the hemolymph. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. chap. 6, p. 355-400.

NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 149-159, 2003.

NAKAMATSU, Y.; FUJII, S.; TANAKA, T. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 48, n. 11, p. 1041-1052, 2002.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação dos insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137 p.

PENNACCHIO, F.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.51, p.233-258, 2006.

QIN, Q.L.; GONG, H.; DING, T. Two collagenases are secreted by teratocytes from *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) cultured *in vitro*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 76, n. 1, p. 79-80, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15/12/2011

RAMÍREZ, M.G.; AVELIZAPA, L.I.R.; AVELIZAPA, N.G.R.; CAMARILLO, R.C. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.56, n.2, p. 213-219, 2004.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S.; LOPES, R.O.M.; SAMPAIO, A.H. Carbohydrate/glycan-binding specificity of legume lectins in respect to their proposed biological functions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 4, p. 349-359, 1999.

RANA, R.L.; DAHLMAN, D.L.; WEBB, B.A. Expression and characterization of a novel teratocyte protein of the braconid, *Microplitis croceipes* (Cresson). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 11, p. 1507-1516, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.

SÉTAMOU, M.; BERNAL, J.S.; LEGASPI, J.C.; MIRKOV, T.E.; LEGASPI JR., B.C. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 2, p. 469-477, 2002.

STOLTZ, D.B. Interactions between parasitoid-derived products and host insects: an overview. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 347-350, 1986.

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

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; De BIANCHI, A.G.D. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 487-494, 1979.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, New York, v. 72, n. 13, p.1538-1550, 2011.

VINSON, S.B. Effect of the parasitoid, *Campoletis sonorensis*, on the growth of its host *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1509-1514, 1972.

_____. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. **Biological Control**, Orlando, v. 11, n. 2, p. 79-96, 1998.

VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.

WANG, S.L.; CHANG, W.T. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Microbiology**, London, v. 63, n. 2, p. 2540-2543, 1997.

WANG, X.; YANG, Z. Ecological mechanisms and prospects for utilization of toxins from parasitic hymenopterans. **Frontiers of Forestry in China**, Beijing, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2008.

WATANABE, T.; UCHIDA, M.; KOBORI, K.; TANAKA, H. Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 residues in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n. 12, p. 2283-2285, 1994.

WEBB, B.A.; STRAND, M.R. The biology and genomics of polydnviruses. In: GILBERT L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. San Diego: Elsevier, 2005. chap. 5, p. 323-360.