

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Érico Augusto Rosas de Vasconcelos

EVOLUÇÃO MOLECULAR NA INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA:
UMA NOVA PROTEÍNA INIBIDORA DE XILANASE (XIP), SIMILAR A QUITINASES
DE CLASSE III DE PLANTAS, QUE AFETA A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DA
FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*)

Brasília
2011

Érico Augusto Rosas de Vasconcelos

EVOLUÇÃO MOLECULAR NA INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA:
UMA NOVA PROTEÍNA INIBIDORA DE XILANASE (XIP), SIMILAR A QUITINASES
DE CLASSE III DE PLANTAS, QUE AFETA A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DA
FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*)

Tese submetida à coordenação do curso de
Doutorado em Biologia Molecular, da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientação: Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

Brasília
2011

Érico Augusto Rosas de Vasconcelos

EVOLUÇÃO MOLECULAR NA INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA:
UMA NOVA PROTEÍNA INIBIDORA DE XILANASE (XIP), SIMILAR A QUITINASES
DE CLASSE III DE PLANTAS, QUE AFETA A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DA
FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*)

Tese submetida à coordenação do curso de
Doutorado em Biologia Molecular, da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Biologia Molecular.

Aprovada em 28/01/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos
Universidade Federal do Ceará

Dr. Thales Lima Rocha
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Luiz Octávio Franco
Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A minha esposa **Maricélia Pereira de Silva Vasconcelos**. Por ter entrado na minha vida e clareado-a, exatamente no meio deste trabalho, e ter achado que isso valia a pena. Pela vida maravilhosa que construímos até agora e pelos próximos momentos que ainda vamos construir.

Aos meus pais **Carlos Lourenço de Vasconcelos** e **Gilca Rosas de Vasconcelos**. Pelos mesmos motivos que aponte na Dissertação de Mestrado e por continuarem aí, se empolgando comigo.

Aos meus irmãos **Eva Maria Rosas de Vasconcelos** e **Elton José Rosas de Vasconcelos**. Também pelos mesmos motivos da Dissertação, porém com mais saudades, pois agora moramos distante uns dos outros.

À Dra. **Maria de Fátima Grossi de Sá**. Tão perto e tão longe, tão brava e tão sensível. Com ela descobri a face da nova conjuntura científica no Brasil, onde ser apenas curioso não basta. Sob seus braços tudo parece muito fácil, e o mundo um lugar pequeno. É incrível observar como uma pessoa tão franzina e pequena, com um rosto tão bonito, pode meter medo em tantos marmanjos e fazer as coisas acontecerem. Se fosse feia e gorda daria um ótimo capitão de alguma tropa de elite. Perto dela eu me sinto um fanfarrão.

Ao Prof. Dr. Amigo **Osmundo Brilhante de Oliveira Neto**. Quem me conseguiu uma vaga no grupo de pesquisa onde essa tese foi planejada, executada e escrita; quem me ajudou a encontrar meu lugar em Brasília; quem me ajudou, por várias vezes, a conseguir um emprego em Brasília; quem discutiu e avaliou comigo meus planos profissionais e pessoais sempre deixando bem claro, e me fazendo ver que, tanto quanto posso ser genial posso ser um idiota.

Ao Prof. Dr. **John A. Gatehouse** e sua esposa **Dra. Angharad** por aceitarem o desafio do projeto que decedi executar num estágio de doutorado no exterior. Sem eles o último capítulo dessa tese não teria sido escrito, e meu estágio no exterior teria sido um desastre. Com John aprendi a melhor palavra para designar um bom resultado em um experimento: “convincente”.

Ao Prof. Dr. **Francisco de Assis de Paiva Campos**. Um mentor intelectual cuja mente eu tentava mimetizar ao fazer uma avaliação crítica dos planos que levariam a essa tese e dos resultados obtidos com eles. Tão longe ele esteve de tudo isso, trago-o para perto agora ao convidá-lo, com receio e/ou vergonha, para a banca examinadora desse trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica que de 2006 à 2010 dividiram a bancada comigo e executaram parte desse trabalho: **Tiago Siqueira Silva**, **Érica Santos do Carmo de Souza**, e mais recentemente até os dias de hoje, **Susane dos Santos Tenenbaum**.

A todos os **amigos e colegas do Laboratório Planta-Praga I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, especialmente aqueles que por ali passaram entre 2005 e 2010, e dividiram comigo os dias do meu doutoramento.

“Think about an experience from your childhood. Something you remember clearly, something you can see, feel, maybe even smell, as if you were really there. After all, you really were there at the time, weren’t you? How else would you remember it? But here is the bombshell: you weren’t there. Not a single atom that is in your body today was there when that event took place... Matter flows from place to place and momentarily comes together to be you. Whatever you are, therefore, you are not the stuff what you are made.”

Steve Grand (1958 –)

RESUMO

Uma busca por novas proteínas entomotóxicas de *Bacillus thuringiensis* S811 indicou que a atividade enzimática quitinolítica contribuía para a toxicidade dessa cepa contra o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Durante os experimentos para a construção de uma molécula recombinante efetiva contra *A. grandis* e que fosse formada pela fusão de uma quitinase com uma toxina Cry, uma nova classe de Proteínas Inibidoras de Xilanases (XIP) foi descoberta dentro da família 8 de Proteínas Relacionadas a Patogênese (PR-8) de Café (*Coffea arabica*), a qual compreende as quitinases de classe III de plantas. Tal proteína foi denominada CaclXIP (*Coffea arabica* Chitinase-Like Xylanase Inhibitor Protein). O gene codificador da proteína inibidora de xilanase paróloga a quitinases de classe III de café (CaclXIP) foi isolado a partir de folhas e subclonado no vetor pGAPZ α -B para expressão em *Pichia pastoris*. Sua seqüência de aminoácidos, que prediz uma topologia do tipo barril (β/α)₈, comum a quitinases de classe III de plantas (família 18 das glicosil hidrolases (GH18)), partilha alta similaridade com outros membros da família GH18, embora ela careça do ácido glutâmico catalítico, que encontra-se substituído por uma glutamina. Ensaios de atividade enzimática com a proteína recombinante purificada mostraram que CaclXIP não apresenta atividade quitinolítica, contudo esta molécula mostrou-se capaz de inibir em 57% a atividade de xilanases de *Acrophialophora nainiana* em uma proporção de 12:1 (enzima:inibidor). Adicionalmente, quando testada a 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, CaclXIP foi capaz de inibir em 45% a germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, o agente causador da Ferrugem asiática, uma doença de difícil controle que afeta severamente os campos de soja no Brasil. Estes resultados indicam que CaclXIP pertence a uma classe de proteínas sem atividade enzimática que evoluiu dentro da família das quitinase de classe III de plantas. Assim como as quitinases, essas novas proteínas também atuam na defesa vegetal, porém como inibidores de xilanases. Seu papel na interferência da germinação de esporos de *P. pachyrhizi* faz dela uma molécula candidata em potencial para programas biotecnológicos que visem o controle da Ferrugem asiática.

ABSTRACT

Looking for a new entomotoxins from *Bacillus thuringiensis* S811, It has been realized that chitinolytic activity of those bacterial protein extracts could contribute to the strain toxicity towards the cotton boll-weevil (*Anthonomus grandis*). During experiments to construct one recombinant molecule lethal to *A. grandis*, and formed by a fusion between a chitinase and a Cry toxin, a new class of Xylanase Inhibitor Proteins (XIP) was discovered into Pathogenesis Related Proteins family 8 (PR-8) from Coffee (*Coffea arabica*), comprehending plants Class III Chitinases. This molecule was named CaclXIP (*Coffea arabica* Chitinase-Like Xylanase Inhibitor Protein). The gene for a xylanase inhibitor protein (XIP), which is paralogous to class III chitinase from coffee (CaclXIP), has been isolated from leaves and subcloned into pGAPZ α -B vector to be expressed in *Pichia pastoris*. Its amino acid sequence, that predicts a (β/α)₈ topology common to Class III Chitinases (glycoside hydrolase family 18 proteins (GH18)), share high similarity with other GH18 members although it lack the catalytic glutamic acid, which is replaced by a glutamine amino acid residue. Enzymatic assay using purified recombinant CaclXIP showed no chitinolytic activity. On the other hand, it has been capable to inhibit xylanases from *Acrophialophora nainiana* in a 57% rate when assayed at a 12:1 (enzyme:inhibitor) ratio. Additionally, when tested at 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, CaclXIP was able to inhibit about 45% the germination of spores of *Phakopsora pachyrhizi*, the agent of Soybean Asian rust, a harsh disease difficult to control in Brazilian soybean fields. These achievements indicate that CaclXIP belongs to a class of proteins without enzymatic activity, which evolved from plants class III chitinase family. Like chitinases, these new proteins works on plant defence too, but as xylanase inhibitors. Moreover, its role in arresting *P. pachyrhizi* spores germination makes it an eligible candidate to biotechnological programs aiming the asian rust control.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema da deposição de cutina e suberina.....	24
FIGURA 2	Modelo de ação das toxinas Cry.....	32
FIGURA 3	A hipótese de que o RNA precede o DNA e as proteínas na evolução molecular.....	35
FIGURA 4	Estrutura elementar de um ribonucleotídeo componente do RNA.....	35
FIGURA 5	Conversão de uma citosina em uracila por desaminação.....	37
FIGURA 6	Evento de transposição direta com replicação do sítio alvo.....	40
FIGURA 7	Duplicação e mutação de genes: uma via para a geração da diversidade bioquímica.....	43
FIGURA 8	Organização em tandem de um segmento intracromossomal de levedura duplicado.....	44
FIGURA 9	Evolução da interação molecular planta-patógeno em cinco estágios.....	47
FIGURA 10	Estrutura secundária e terciária de XIP-I.....	49
FIGURA 11	Modelo do complexo ternário entre XIP-I e duas xilanases das famílias GH10 e 11.....	49
FIGURA 12	O Algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i>).....	53
FIGURA 13	Bicudo-do-algodoeiro (<i>Anthonomus grandis</i>).....	53
FIGURA 14	Vias de RNAi em plantas.....	58
FIGURA 15	A soja (<i>Glycine max</i>).....	65
FIGURA 16	Esporo de um Uredinales em início de germinação.....	75
FIGURA 17	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> infectando folhas de soja.....	77

FIGURA 18	Aspectos de uma cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> S811 vista por contraste de fase.....	96
FIGURA 19	Caracterização do crescimento de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811	98
FIGURA 20	SDS–PAGE das proteínas da fração celular, da fração do sobrenadante e de cristais purificados de <i>B. thuringiensis</i> S811.....	99
FIGURA 21	Western blot das frações celulares e do sobrenadante de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811.....	100
FIGURA 22	Atividade entomotóxica das frações celulares e do sobrenadante de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811 para larvas de <i>A. grandis</i>	101
FIGURA 23	Proteínas da fração celular de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811 resolvidas por 2-DE.....	103
FIGURA 24	Proteínas da fração do sobrenadante de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811 resolvidas por 2-DE.....	104
FIGURA 25	Proteínas da fração celular de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811, identificadas por MS, e que são sintetizadas no estágio com atividade tóxica para <i>A. grandis</i>	105
FIGURA 26	Proteínas da fração do sobrenadante de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811, identificadas por MS, e que são sintetizadas no estágio com atividade tóxica para <i>A. grandis</i>	106
FIGURA 27	Atividade quitinolítica na fração celular e do sobrenadante de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811.....	109
FIGURA 28	Seqüência de bases do contig 14550 do Genoma Café.....	117
FIGURA 29	Eletroforese em gel de agarose 0,8% para a visualização da amplificação da região de <i>caciiichit</i> codificadora da proteína.....	118
FIGURA 30	Alinhamento de genes de uma quitinase de <i>Bacillus thuringiensis</i>	124
FIGURA 31	Seqüência de aminoácidos da região madura das proteínas previstas pelas seqüências dos genes do contig 14550 e do gene <i>caciiichit</i>	127
FIGURA 32	Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% para a detecção da proteína heteróloga em culturas de <i>P. pastoris</i> transformadas com pGAPZα-B/ <i>caciiichit</i>	127

FIGURA 33	Western blot para a detecção da proteína heteróloga em culturas de <i>P. pastoris</i> transformadas com pGAPZ α -B/ <i>caciiiichit</i>	128
FIGURA 34	Determinação do peso molecular da proteína heteróloga por curva logarítmica de migração relativa.....	128
FIGURA 35	PCR de colônia para confirmação da integração de pGAPZ α -B/ <i>caciiiichit</i> na colônia que expressava a proteína heteróloga.....	129
FIGURA 36	Purificação de CacIIIChit.....	129
FIGURA 37	Ensaio de atividade quitinolítica com as frações protéicas obtidas durante a expressão e purificação de CacIIIChit.....	131
FIGURA 38	Alinhamento das seqüências de aminoácidos de proteínas da família GH18 e predição das estruturas secundárias.....	140

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais propriedades das famílias de proteínas relacionadas à patogênese.....	26
TABELA 2	Diferenças entre quitinases das famílias de glicosil-hidrolases 18 e 19.....	28
TABELA 3	Esquema geral da ocorrência de pragas na cultura do algodoeiro.....	54
TABELA 4	Principais países produtores de soja (em milhões de toneladas).....	67
TABELA 5	Área de plantio X produtividade nas principais regiões e estados produtores no Brasil.....	69
TABELA 6	Identificação e cinética de deposição de proteínas de uma cultura de <i>B. thuringiensis</i> S811.....	107
TABELA 7	Avaliação da atividade inibitória de CaclXIP para xilanases de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Acrophialophora nainiana</i>	142
TABELA 8	Avaliação da atividade de CaclXIP sobre a germinação de esporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	144

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
Genes R	Genes de resistência
GH	Glicosil hidrolase
GM	Geneticamente modificado
HAI	Horas após a inoculação
IEF	Focalização isoeétrica
IPG	Gel com gradiente imobilizado de pH
MALDI	Ionização por Desorção a Laser Auxiliada por Matriz
MS	Espectrometria de massa
PBS	Tampão fosfato salino
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PR	Relacionado à patogênese
q.s.p	Quantidade suficiente para
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP	Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
RNAi	RNA interferente
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T.E.	Tris(hidroximetil)aminometano /EDTA
TBE	Tris(hidroximetil)aminometano /Borato/EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
U.R.	Umidade relativa
VIP	Proteína vegetativa inseticida

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
PRÓLOGO	17
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
I.I. Bioquímica da defesa vegetal	
I.I.I. Fisiologia do estresse vegetal a fatores abióticos.....	20
<i>I.I.I.I. Déficit hídrico</i>	20
<i>I.I.I.II. Baixas temperaturas e congelamento</i>	20
<i>I.I.I.III. Altas temperaturas e choque térmico</i>	21
<i>I.I.I.IV. Salinidade</i>	21
<i>I.I.I.V. Estresse oxidativo</i>	22
I.I.II. Resposta celular a estresses biótico.....	22
<i>I.I.II.I. Proteção superficial</i>	22
<i>I.I.II.II. Compostos secundários de defesa</i>	23
<i>I.I.II.III. Proteínas relacionadas à patogênese</i>	25
I.I.III. Quitinases de plantas na defesa vegetal.....	27
I.I.IV. Inibidores de enzimas que degradam a parede celular no contra-ataque da célula vegetal.....	30
I.I.V. Defesa externa: bactérias entomopatogênicas - <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
I.II. Evolução molecular na interação planta-praga	
I.I.I.I. Como os genomas evoluem?.....	33
<i>I.I.I.I.I. Da bioquímica pré-biótica aos genomas, pelo mundo de RNA</i>	33
<i>I.I.I.I.II. Erros de disjunção e rearranjos não balanceados na meiose</i>	38
<i>I.I.I.I.III. Elementos Genéticos Transponíveis (Transposons), infecções virais e transferência genética horizontal</i>	39
<i>I.I.I.I.IV. Falhas no mecanismo natural de replicação e manutenção do DNA</i>	41
I.I.II. Evolução dos genes de resistência em plantas.....	45
<i>I.I.II.I. De quitinases a inibidores de xilanas</i>	46
I.III. Estratégias moleculares para o controle de pragas nos campos de algodão	
I.III.I. O algodão: aspectos botânicos, produção e agronegócio no Brasil e no mundo.....	50
I.III.II. Principais pragas nos campos de algodão do Brasil.....	51
I.III.III. Controle de pragas nos campos de algodão do Brasil.....	52
I.III.IV. Estratégias moleculares para o controle de pragas que afetam o algodão.....	52

I.III.IV.I. Moléculas candidatas.....	55
I.III.IV.II. Técnicas e aplicações.....	55
I.IV. Alvos moleculares para o controle de fungos fitopatogênicos	
I.IV.I. Atividade xilanásica na interação planta-fungo.....	59
I.IV.II. Xilanases como alvo para o controle de fungos fitopatogênicos.....	60
I.V. O Projeto Genoma Café	
I.V.I. Histórico.....	61
I.V.II. O Genoma Café como fonte de genes para uso biotecnológico.....	62
I.VI. A soja (<i>Glycine max</i>)	
I.VI.I. Aspectos botânicos, origem e histórico agrícola.....	63
I.VI.II. Produção e agronegócio no Brasil e no mundo.....	66
I.VI.III. Pragas, doenças e controle fitossanitário nos campos de soja.....	68
I.VI.IV. Biotecnologia aplicada à produção de soja.....	72
I.VII. A Ferrugem asiática (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>)	
I.VII.I. Aspectos microbiológicos.....	74
I.VII.II. A Ferrugem asiática como uma doença nos campos de soja.....	76
I.VII.III. O controle da Ferrugem asiática.....	78
I.VII.IV. Possibilidades biotecnológicas para o controle da Ferrugem asiática.....	80
II. JUSTIFICATIVA.....	82
III. HIPÓTESE.....	84
IV. OBJETIVOS	
IV.I. Objetivo geral.....	87
IV.II. Objetivos específicos.....	87
V. CAPÍTULO 1 - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA PATOGÊNICIDADE DO	
<i>Bacillus thuringiensis</i> (S811) CONTRA O BICUDO-DO-ALGODOEIRO	
(<i>Anthonomus grandis</i>; COLEOPTERA)	
V.I. Introdução ao primeiro capítulo.....	89
V.II. Metodologia	
V.II.I. Cultivo do <i>Bacillus thuringiensis</i> S811.....	91
V.II.II. Extração de proteínas e purificação de cristais.....	91
V.II.III. Bioensaios com larvas neonatas de <i>Anthonomus grandis</i>	92
V.II.IV. Eletroforese e Western blot.....	92
V.II.V. Eletroforese Bidimensional e processamento de imagens.....	93
V.II.VI. Excisão de spots, digestão triptica e espectrometria de massa para	
identificação de proteínas.....	94
V.II.VII. Ensaio de atividade quitinolítica.....	94
V.III. Resultados e Discussão	
V.III.I. Crescimento bacteriano e síntese de proteínas.....	95
V.III.II. Análise temporal da síntese de toxinas durante o cultivo de	
<i>B. thuringiensis</i> S811 e atividade contra <i>A. grandis</i>	97

V.III.III. Análise proteômica do <i>B. thuringiensis</i> S811.....	102
V.IV. Conclusão e Perspectivas.....	110
INTERLÚDIO 1.....	111
VI. CAPÍTULO 2 - TENTATIVA DE CONSTRUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO CRY8/BTCHIT PARA O CONTROLE DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO (<i>Anthonomus grandis</i>)	
VI.I. Introdução ao segundo capítulo.....	113
VI.II. Metodologia	
VI.II.I. Tentativa de clonagem de uma quitinase de <i>B. thuringiensis</i>	115
VI.II.II. Clonagem do gene de uma quitinase de classe III de café (<i>Coffea arabica</i>) (<i>caciiichit</i>) para expressão em <i>Pichia Pastoris</i>	116
VI.II.III. Subclonagem de <i>caciiichit</i> em um vetor para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	116
VI.II.IV. Transformação de <i>Pichia pastoris</i> com pGAPZ α -B/ <i>caciiichit</i> e ensaios de expressão em pequena escala.....	119
VI.II.V. PCR de colônia para confirmação da integração de <i>caciiichit</i>	120
VI.II.VI. SDS-PAGE e Western blot para a detecção da expressão de <i>caciiichit</i> recombinante.....	120
VI.II.VII. Expressão de <i>caciiichit</i> em larga escala (fermentação).....	121
VI.II.VIII. Purificação de CacIIChit.....	121
VI.II.IX. Ensaio de atividade enzimática de CacIIChit.....	121
VI.III. Resultados e Discussão	
VI.III.I. Tentativa de clonagem de uma quitinase de <i>B. thuringiensis</i>	123
VI.III.II. Subclonagem de <i>caciiichit</i> em um vetor para expressão em <i>P. pastoris</i>	123
VI.III.III. Expressão e purificação de <i>caciiichit</i>	126
VI.III.IV. Ensaio de atividade quitinolítica.....	130
VI.IV. Conclusão e Perspectivas.....	132
INTERLÚDIO 2.....	133
VII. CAPÍTULO 3 - UMA NOVA PROTEÍNA INIBIDORA DE XILANASE SIMILAR A QUITINASE DO CAFÉ (<i>Coffea arabica</i>) QUE AFETA A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DA FERRUGEM ASIÁTICA (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>)	
VII.I. Introdução ao terceiro capítulo.....	135
VII.II. Metodologia	
VII.II.I. Predição de estruturas secundárias de CaclXIP por homologia e comparação com outros membros da família GH18.....	137
VII.II.II. Ensaio de inibição da atividade xilanásica.....	137
VII.II.III. Ensaio de inibição da germinação dos esporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	137
VII.III. Resultados e Discussão	

VII.III.I. Comparação de CaclXIP com outras proteínas de família GH18 e proteínas similares à GH18.....	139
VII.III.II. Avaliação de CaclXIP na defesa vegetal.....	141
VII.III.III. Contenção da germinação de esporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> por CaclXIP.....	143
VII.IV. Conclusão e Perspectivas.....	145
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
EPÍLOGO.....	166
APÊNDICE	
1. Soluções.....	168
2. Meios de cultura.....	170
3. Procedimentos.....	171
ANEXOS	
1. Artigos científicos publicados durante o doutoramento	
1.1. Relacionados a tese.....	174
1.2. Não relacionados a tese.....	177
2. Documentos relativos ao Estágio Sanduíche no Exterior	
2.1. Carta de benefícios do CNPq.....	178
2.2. Carta do orientador no Brasil: comentários finais sobre o desempenho do bolsista.....	180
2.3. Carta do orientador no exterior: comentários finais sobre o desempenho do bolsista.....	181
2.4. Certificado de conclusão do estágio.....	182
3. Trabalhos apresentados em Encontros, Congressos e Workshop.....	183

PRÓLOGO

Prólogo:

- 1) “discurso ou advertência que antecede a obra escrita”;
- 2) “Parte introdutória ou prefácio de um discurso”;
- 3) “Qualquer ato, evento introdutório”.

Dadas as possíveis definições, ficará claro aqui o porquê desta tese tanto precisar de um discurso ou advertência que a anteceda, de um ato introdutório, afinal, nos primeiros 2 anos e meio do meu doutoramento, de 2006 à metade de 2008, investiguei nuances moleculares responsáveis pela toxicidade de uma cepa de *Bacillus thuringiensis* para o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e, ao final, apresento uma tese sobre uma nova molécula com atividade inibitória para xilanases de fungos. Não, não se trata de um arranjo burocrático para salvar o doutorado de um estudante incompetente. Este prólogo justificará tamanha guinada.

Foram 2 anos e meio ao lado do colega Tiago Siqueira Silva, então estudante de iniciação científica, que renderam aproximadamente 10 comunicações em workshops, congressos e encontros nacionais e internacionais, incluindo o Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de 2007, no qual Tiago ganhou o prêmio de melhor trabalho pelo nosso pôster. Renderam ainda um manuscrito que, depois de pronto, a equipe decidiu por não publicar. Foram 2 anos e meio trabalhando com uma bactéria (*B. thuringiensis*), um inseto (*A. grandis*) e uma planta (*Gossypium hirsutum*), o algodoeiro.

Na segunda metade de 2008 realizei um estágio de doutorado no exterior, mais precisamente na Universidade de Durham, no Reino Unido. Nos seis meses que se passaram ali, muitos experimentos foram feitos e todos os resultados apenas desacreditavam os planos que eu tinha para o *B. thuringiensis*, o *A. grandis* e o *G. hirsutum*. Todos os resultados mostravam que não seria possível, ou não faria sentido, executar o que eu planejara. Em novembro de 2008 eu já imaginava ter de voltar ao Brasil dali a pouco mais de um mês para, no ano seguinte, concluir minha tese com os dados que eu já dispunha antes de iniciar o estágio sandwich. A estada em Durham, então, de nada serviria, senão apenas como um estágio técnico em um laboratório, em um país distante, em uma cidade fria. E teria sido exatamente assim, se não fosse a perspicácia do meu orientador no exterior, Dr. John A. Gatehouse, que me mostrou que o motivo da falência do meu projeto era um elegante mecanismo de evolução molecular na interação planta-praga. A molécula da qual eu dispunha e para a qual reservara grandes planos não era exatamente o que parecia ser. Era sim uma “parente” evolutivamente muito próxima daquela molécula que eu

imaginara. Um novo paradigma surgia então na vida deste doutorando: valeria à pena engavetar os trabalhos com o *B. thuringiensis*, o *A. grandis* e o *G. hirsutum* para no último ano de doutoramento investigar mais a fundo e escrever sobre aquele elegante mecanismo de evolução molecular? Em janeiro de 2009 desembarquei no aeroporto internacional de Brasília com tudo o que havia levado, porém na cabeça a bagagem era diferente. A preocupação com o inseto (*A. grandis*) foi direcionada para um fungo (*Phakopsora pachyrhizi*), e a vontade de defender o algodoeiro (*G. hirsutum*) daquele inseto, agora havia sido mobilizada para a soja (*Glycine max*) e a proteção dela contra o *P. pachyrhizi*, causador da Ferrugem asiática. Eu não mais queria escrever sobre as proteínas entomotóxicas de *B. thuringiensis* na interação entre o bicudo e o algodoeiro, mas sim sobre uma peculiar proteína do café, cujo gene havia sido erroneamente anotado no banco de dados do Projeto Genoma Café, e que se apresentava com potencial para aplicação em programas biotecnológicos de melhoramento da soja contra a Ferrugem asiática. No ano de 2009, com o auxílio do Prof. Edivaldo Ximenes, do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, e da Dra. Marília Silva, da Embrapa Cerrados, junto a pesquisadores da Embrapa Soja, de Londrina, consegui resultados que justificaram a publicação do artigo “A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination”, na revista BMC Biotechnology. Os dados publicados foram os utilizados na elaboração desta tese.

Vejo este prólogo mais como uma carta ao leitor que justifique o modo pelo qual a idéia inicial se transformou tão bruscamente no último ano de doutorado. De como eu transformei um inseto em fungo, e algodão em soja. Nos itens seguintes apresentarei todos os dados que obtive com o *B. thuringiensis* e com o *A. grandis*, e como esses dados me levaram a descobrir a nova molécula sobre a qual esta tese foi escrita.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.I. BIOQUÍMICA DA DEFESA VEGETAL

I.I.I. Fisiologia do estresse vegetal a fatores abióticos

Estresse vegetal é freqüentemente definido como um fator externo que exerce uma desvantagem sobre a planta, seja no referente ao crescimento (acúmulo de biomassa), seja no referente aos processos primários de assimilação de CO₂ e minerais. O conceito de estresse está intimamente associado à *resistência ao estresse*, que consiste na *aclimação* da planta às novas condições ambientais, que podem variar no tocante à disponibilidade de água, temperatura e salinidade. Aqui serão apresentados mecanismos fisiológicos pelos quais as plantas respondem às variações destas condições.

I.I.I.I. Déficit hídrico

Existem pelo menos três tipos de plantas que utilizam diferentes mecanismos para contornar situações de déficit hídrico: i) plantas que mantêm seus tecidos hidratados mesmo com baixa disponibilidade de água, ii) plantas que desempenham suas funções metabólicas normais mesmo desidratadas, iii) plantas que completam todo o seu ciclo de vida durante a estação úmida. Em cada um desses casos as respostas apresentadas pelas plantas seguem alguns padrões básicos, como a diminuição da área foliar (Gheysari *et al.*, 2009) com possível abscisão foliar como meio de ajuste da diminuição da área (Escudero, *et al.*, 2008) e conseqüente diminuição da taxa fotossintética (Rao *et al.*, 1987); diminuição da capacidade foliar de dissipar energia (Lauriano *et al.*, 2006); extensão radicular (Ito *et al.*, 2006); fechamento dos estômatos (Souza *et al.*, 2005) e espessamento da camada de cera na cutícula (Kim *et al.*, 2007).

I.I.I.II. Baixas temperaturas e congelamento

Plantas respondem a queda moderada de temperatura alterando a composição de ácidos graxos em suas membranas celulares. Plantas resistentes a baixas temperaturas apresentarão uma razão de ácidos graxos saturados/insaturados menor que as sensíveis, o que eleva a fluidez da membrana a baixas temperaturas, impedindo que ela se solidifique em um estado semi-cristalino (Gulen *et al.*, 2009). A retirada de água do protoplasto, que impede a formação de cristais de gelo dentro da célula, também é uma estratégia utilizada por plantas que crescem em altas latitudes (Pearce, 2001). Proteínas também estão envolvidas com a aclimação e resistência às baixas temperaturas, seja pelo alívio direto do estresse, com a síntese de proteínas anticongelamento; seja na transdução de sinais com as proteínas de ligação ao Ca²⁺ (calmodulina e proteínas quinase dependentes de Ca²⁺). Recentemente Winfield e colaboradores

fizeram uma revisão sobre os mecanismos bioquímicos de resposta das plantas a baixas temperaturas (Winfield *et al.*, 2010).

I.I.I.III. Altas temperaturas e choque térmico

À medida que a temperatura se eleva, tanto a fotossíntese como a respiração são inibidas, sendo que a taxa de queda fotossintética é mais elevada que a taxa de queda respiratória. A temperatura na qual a quantidade de CO₂ fixado pela fotossíntese não é mais suficiente para compensar o CO₂ liberado na respiração é denominada *ponto de compensação de temperatura*. Neste ponto as reservas de carboidratos das plantas começam a declinar. Este desbalanceamento entre a taxa fotossintética e a respiração celular é uma das principais causas dos efeitos deletérios das altas temperaturas (Taiz & Zeiger, 1991). Assim como no estresse por baixas temperaturas, a composição de fosfolipídios da membrana celular em altas temperaturas também sofre alteração, sendo que neste caso a razão de ácidos graxos saturados/insaturados é maior nas plantas resistentes (Raison *et al.*, 1982). Uma classe especial de proteínas conhecidas como *Heat Shock Proteins* (HSPs) são sintetizadas poucos minutos após uma elevação abrupta de temperatura, fazendo com que certas plantas tolerem temperaturas antes letais (Viswanathan & KhannaChopra, 1996; Hua, 2009).

I.I.I.IV. Salinidade

As plantas colonizam diferentes regiões do planeta onde a composição salina no solo e na água varia, desde regiões marítimas e estuarinas, com alta concentração salina, até florestas tropicais, com baixa concentração salina. Plantas que naturalmente toleram altas concentrações salinas são ditas *halofitas*, enquanto as que dependem de um ambiente com baixas concentrações de sais são ditas *glicofitas*. Acima de uma concentração salina limite, plantas glicofitas apresentarão sintomas como inibição do crescimento, descoloração foliar, e perda de massa seca. Com o aumento da concentração salina na rizosfera há uma conseqüente queda do potencial hidrostático naquela região, o que faz com que as células vegetais devam realizar um ajuste osmótico para baixar ainda mais seus potenciais hídricos a fim de se manter o fluxo de água da rizosfera para os tecidos vegetais (Taiz & Zeiger, 1991). As plantas utilizam diferentes estratégias para diminuir o potencial hidrostático intracelular, dentre elas o acúmulo de sais de Na⁺, Cl⁻ e ácidos orgânicos nos vacúolos (Flowers & Colmer, 2008), a inibição da síntese de sacarose e utilização da frutose para a síntese de manitol, o qual se acumula no citoplasma para aumentar o potencial osmótico celular (Buchanan *et al.*, 2000); e a síntese de proteínas associadas com o aumento da tolerância a NaCl (Tada & Kashimura, 2009).

I.I.I.V. Estresse oxidativo

Diversos fatores abióticos além dos já citados aqui, como luminosidade intensa, trauma mecânico, herbicidas e ozônio; tanto quanto fatores bióticos como patógenos, podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células vegetais, tais como $^1\text{O}_2$, H_2O_2 e O_2^- (Buchanan *et al.*, 2000). Para se proteger dessas moléculas altamente reativas as células vegetais se utilizam de moléculas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase, vitamina C, glutatona reduzida, vitamina E, carotenóides, poliaminas, e flavonoides, cuja síntese e atividade são aumentadas em situações de estresse (Lall *et al.*, 1999).

I.I.II. Resposta celular vegetal a estresses bióticos

Além dos fatores abióticos apresentados no item anterior (intempéries ambientais físicas e químicas, e extremos de temperatura), as plantas, nos seus habitats naturais também se encontram rodeadas por um grande número de predadores e patógenos em potencial, como mamíferos, insetos, nematóides, fungos, bactérias e vírus. Diferente dos animais as plantas não podem simplesmente mover-se para evitar tais fatores, por tanto, ao longo da história evolutiva desse grupo de organismos, fez-se necessário o desenvolvimento de sofisticados mecanismos de defesa contra estresses de ordem biótica e abiótica, que vão desde adaptações estruturais na anatomia vegetal à respostas bioquímicas que compõem a fisiologia do estresse (Taiz & Zeiger, 1991; Sebanek, 1992).

I.I.II.I. Proteção superficial

Cutina, suberina e ceras são compostos de longas cadeias saturadas de carbono que compõem a cutícula vegetal, uma estrutura de múltiplas camadas que recobre a parede celular externa da epiderme vegetal. Com caráter hidrofóbico, esta estrutura ajuda a reduzir a perda de água por transpiração além de compor a primeira barreira física contra a invasão de patógenos. A cutina é o principal componente da cutícula, sendo o primeiro alvo das cutinases secretadas por fungos durante o processo de infecção (Köllner *et al.*, 1995). Estudos recentes têm mostrado a importância dessa classe de lipase na capacidade infectiva de alguns fungos fitopatogênicos (Skamnioti & Gurr, 2007, Li *et al.*, 2003). A suberina, similar a cutina, é um polímero de longas cadeias de ácidos graxos, hidroxiácidos e alcoóis. Porém, diferente da última, não possui ácidos dicarboxílicos e é um componente da parede celular vegetal bastante abundante em tecidos internos das raízes, onde atuam na regulação da absorção e do transporte de água (Baxter *et al.*,

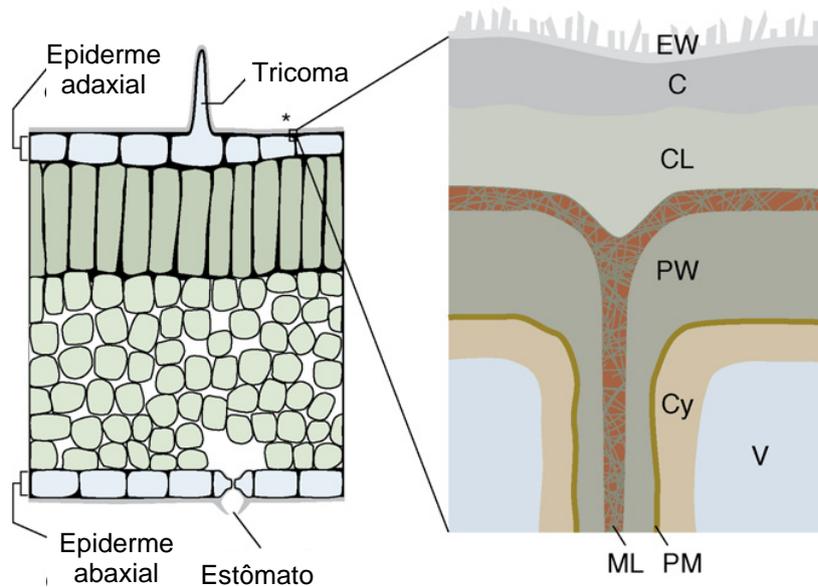
2009). A suberização é fundamental para o crescimento secundário de troncos e raízes. Tecidos suberizados também são formados nas zonas de abscisão de folhas e em regiões lesionadas (Taiz & Zeiger, 1991). A figura 1 mostra um esquema da localização das camadas de cutina e suberina em partes aéreas e radiculares de plantas. Recentemente a estrutura e o processo de biossíntese destes polímeros foram revistos por Pollard e colaboradores (Pollard *et al.*, 2008). As ceras não são macromoléculas, como a cutina e a suberina, mas misturas de lipídios de cadeia longa extremamente hidrofóbicos sintetizados por glândulas das células epidérmicas. O papel destas moléculas, juntamente com as outras duas componentes da cutícula na defesa e imunidade vegetal foi revisto recentemente por Pinto e Yephremov (Pinto & Yephremos, 2009). Como componentes das ceras, metabólitos secundários como terpenos, compostos fenólicos, e alcalóides, são freqüentemente encontrados compondo uma nova linha de defesa vegetal (Jetter *et al.*, 2006).

I.I.II.II. Compostos secundários de defesa

Os compostos secundários de defesa diferem dos metabólitos primários (proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos) por não possuírem papel nos mecanismos metabólicos básicos como assimilação de CO₂, respiração, transporte e diferenciação celular. Estas moléculas atuam principalmente na defesa vegetal contra herbivoria e ataque de patógenos, bem como em processos ecológicos, como a atração de agentes polinizadores e animais dispersores de frutos. Existem quatro grupos principais de metabólitos secundários: *terpenóides*, *compostos fenólicos*, *flavonóides* e *alcalóides* (Taiz & Zeiger, 1991; Sebanek, 1992).

Terpenóides são derivados do mevalonato e podem ser classificados como: i) monoterpenos, que compreendem os óleos essenciais com propriedades de repelência para insetos (Lucia *et al.*, 2009); ii) diterpenos, como o ácido abiético, componente das resinas de plantas que impedem a formação de canais de alimentação por insetos (Martin *et al.*, 2002); iii) triterpenos, que compreendem os esteróis vegetais, como o sitosterol (com função análoga ao colesterol das membranas celulares animais) e as fitoecdisonas, que interferem na formação do exoesqueleto dos insetos (Zeleny *et al.*, 1997); iv) Politerpenos, que compreendem terpenos de alta massa molecular que compõem o látex de algumas plantas, como a seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Hagel *et al.*, 2008).

Compostos fenólicos compõem um grupo de metabólitos secundários quimicamente heterogêneo, possuindo tanto representantes hidrofóbicos quanto hidrofílicos. A furanocoumarina é um composto fenólico de especial interesse, pois quando ativada por radiações excitantes (UV-A), pode se ligar as bases nitrogenadas pirimidínicas do DNA



*Modificado de Pollard, M. (2008), *Trends in Plant Science*

Figura 1: Esquema da deposição de cutina e suberina. Exemplo da deposição de cutina nas folhas. Deposições ricas em lignina e celulose formam as paredes celulares secundárias, localizada entre a lamela de suberina e a membrana plasmática. (EWs) *Epicuticular waxes*: Ceras epicuticulares; (C): *Cúticula*; (CL) *cuticular layer*: Camada cuticular; (ML) *Middle lamellae*: Lamela media; (PWs) *Primary cell walls*: Paredes celulares primárias; (PM) *Plasma membrane*: Membrana plasmática; (Cy) *Cytoplasm*: Citoplasma; (V) *Vacuole*.

bloqueando a transcrição e os mecanismos de reparos, levando a morte celular. O nível de produção desses compostos é aumentado em plantas estressadas ou doentes (Gijsegem *et al.*, 1995). Além de atuar na defesa vegetal contra herbivoria, compostos fenólicos também podem combater a competição com outras plantas. O ácido caféico e o ácido ferrúlico, que se acumulam no solo, podem afetar a germinação de sementes e o crescimento de algumas plantas com diferente alelopatia (Kong *et al.*, 2008).

Flavonóides compreendem o mais vasto grupo de metabólitos secundários, onde se encontram as antocianinas, as flavonas, os flavonóis e os isoflavonoides. Enquanto as antocianinas desempenham mais uma função ecológica de atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes, as flavonas e os flavonóis protegem tecidos como folhas da radiação UV. Isoflavonóides, como as fitoalexinas, possuem atividade antimicrobiana e são rapidamente sintetizados no local de uma infecção (Pedras *et al.*, 2009).

Alcalóides são compostos heterocíclicos que contêm nitrogênio. Durante muito tempo acreditou-se que esses compostos pertenciam a alguma classe de excretas nitrogenados (como uréia e ácido úrico), ou compostos de armazenagem de nitrogênio. Hoje diversos alcalóides são conhecidos por sua neuroatividade em mamíferos, sendo a morfina o mais conhecido alcalóide neuroativo utilizado farmacologicamente. Na defesa vegetal, essa classe de molécula encontra-se envolvida na contenção da herbivoria (Vilarino & Ravetta, 2008).

I.I.II.III. Proteínas relacionadas à patogênese

Compreendem um grupo de proteínas codificadas por genes não homólogos cuja expressão é induzida por contato com patógenos ou situações semelhantes. A síntese dessas proteínas pode se dar unicamente no local da infecção ou pode ser induzida sistemicamente, associada ao desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (Van Loon *et al.*, 1999). Atualmente as proteínas relacionadas à patogênese (PRP) encontram-se organizadas em 17 famílias, cujos critérios de classificação levam em conta o grau de identidade entre as seqüências de aminoácidos, o relacionamento sorológico e a atividade biológica/enzimática (Tabela 1). O mecanismo de ação pelo qual essas PRPs atuam na defesa vegetal é variável, podendo-se encontrar proteínas que degradam a parede celular, ou a membrana celular; proteinases e ribonucleases; inibidores de proteases e proteínas envolvidas no metabolismo oxidativo (Sels, *et al.*, 2008). Dentre as 17 famílias listadas na tabela 1, as famílias PR-3, 4, 8 e 11 compreendem diversas classes de quitinases, um grupo heterogêneo de moléculas que atuam na defesa vegetal contra o ataque de fungos e patógenos. Essa complexa família de PRP será discutida nos itens seguintes.

Tabela 1: Principais propriedades das famílias de proteínas relacionadas à patogênese.

Família	Tamanho (kDa)	Propriedade	Alvo	Referência
PR-1	15	Antifúngica	Desconhecido	Antoniw (1980)
PR-2	30	β -1,3- Glucanase	β -1,3-Glucano	Antoniw (1980)
PR-3	25-30	Quitinase (Classe I,II,IV,V,VI,VII)	Quitina	Van Loon (1982)
PR-4	15-20	Quitinase (Classe I,II)	Quitina	Van Loon (1982)
PR-5	25	Similar à Taumatina	Membrana	Van Loon (1982)
PR-6	8	Inibidor de proteinase	— ^a	Green (1972)
PR-7	75	Endoproteinase	— ^a	Vera (1988)
PR-8	28	Quitinase (Classe III)	Quitina	Métraux (1988)
PR-9	35	Peroxidase	— ^a	Lagrimini (1987)
PR-10	17	Similar à Ribonuclease	— ^a	Somssich (1986)
PR-11	40	Quitinase (Classe I)	Quitina	Melchers (1994)
PR-12	5	Defensina	Membrana	Terras (1995)
PR-13	5	Tionina	Membrana	Epple (1995)
PR-14	9	Proteína transportadora de lipídios	Membrana	García-Olmedo (1995)
PR-15	20	Oxalato oxidase	— ^a	Zhang (1995)
PR-16	20	Similar à Oxalato oxidase	— ^a	Wei (1998)
PR-17	27	Desconhecida	— ^a	Okushima (2000)

^a Atividade « in vitro » ainda não detectada.

*Modificado de J. Sels et al. (2008), *Plant Physiology and Biochemistry*

I.I.III. Quitinases de plantas na defesa vegetal

Dentre as diversas famílias de proteínas relacionadas à patogênese vegetal apresentadas no tópico anterior, aqui serão abordados maiores detalhes sobre a natureza bioquímica e aspectos da ação fisiológica na interação planta-praga das classes de proteínas PR que compreendem as quitinases.

Quitinases (EC 3.2.1.14) pertencem a um grupo heterogêneo de proteínas hidrolíticas que clivam ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ em biopolímeros de *N*-acetilglicosamina. A clivagem pode se dar internamente no polissacarídeo (endoquitinases), formando pequenos oligômeros de *N*-acetilglicosamina; ou nas extremidades não redutoras do polissacarídeo (exoquitinases), liberando monômeros de *N*-acetilglicosamina (Kasprzewska, 2003). Atualmente são reconhecidas 7 famílias de quitinases subdivididas em dois grupos de Glicosil-hidrolases (GH), GH18 e GH19; de acordo com características estruturais e com o mecanismo de catálise (Tabela 2). A presença de enzimas com atividade quitinolítica já foi detectada nos mais diferentes grupos taxonômicos cuja morfogenia é independente de quitina, como peixes, moluscos, anfíbios, mamíferos e plantas, incluindo vírus; organismos estes nos quais quitinases desempenham um papel na defesa celular, ou, no caso dos vírus, na infecção. Adicionalmente, em plantas, o papel dessas moléculas vai além da atuação nos mecanismos de defesa, atuando também em processos de crescimento e desenvolvimento (de Jong *et al.*, 1992). Em alguns casos a indução da expressão de genes de quitinases parece não responder a um estímulo primário bem definido, como, por exemplo, no caso da indução por etileno, onde genes de quitinases são ativados por encontrarem-se sob o controle de “elementos de resposta ao etileno” (ERE – *Ethylene responsive elements*) (Shimono *et al.*, 2002). Em situações de cultivo de células *in vitro*, quitinases são freqüentemente acumuladas de forma abundante no meio de cultura (Vasconcelos, *et al.*, 2005), porém a indução dessas moléculas, parece ser reprimida por auxinas e citocinas (Kasprzewska, 2003).

A indução de genes de quitinases durante processos de infecção pode se dar de forma local ou sistêmica, dependendo do patógeno, da virulência apresentada por ele e da classe de quitinase induzida (Passarinho *et al.*, 2001). O acúmulo dessas moléculas acontece no apoplasto ou nos vacúolos, sendo as quitinases do apoplasto mais envolvidas com os estágios iniciais da infecção, liberando moléculas elicitoras relacionadas à transdução de sinais. Já as quitinases vacuolares atuam nos estágios tardios da infecção, quando a hifa penetra e destrói a célula

Tabela 2: Diferenças entre quitinases das famílias de glicosil-hidrolases 18 e 19.

Família GH	Classe de Quitinase	Mecanismo de catálise	Intermediário	Configuração anomérica do produto	Inibidores
18	III e V	Substrato-dependente	íon oxazolinico	β	allosamidina
19	I, II, IV, VI e VII	acídica	íon oxocarbênico	α	amidinas e amidrazonas

**Modificado de Kasprzewska (2003), Cellular & Molecular Biology Letters*

Neste estágio, por meio da degradação das cadeias de quitina recém-sintetizadas o crescimento da hifa é contido (Collinge *et al.*, 1993).

Classificação e estrutura das quitinases de plantas. Até 1993 eram reconhecidas 4 classes de quitinases de plantas (Collinge *et al.*, 1993). Quitinases de classe I, que possuem um domínio rico em cisteína na região N-terminal com aproximadamente 40 aminoácidos, que atua como um domínio de ligação a quitina; Quitinases de classe II, com alto grau de identidade de seqüência com as de classe I, porém carecendo da região N-terminal rica em cisteína; Quitinases de classe III, que apresentam uma topologia em barril (β/α)₈ e um mecanismo de catálise diferenciado (Tabela 2); e quitinases de classe IV, que apresentam estrutura similar a de quitinases de classe I, porém são significativamente menores devido a quatro deleções (Rasmussen *et al.*, 1992; Ubhayasekera *et al.*, 2009). Em 1994 novas classes de quitinases foram descritas: as quitinases de classe V, que partilham a mesma topologia e tipo de catálise das quitinases de classe III, porém a seqüência de aminoácido possui maior identidade com as de quitinases bacterianas (Heitz *et al.*, 1994; Taira *et al.*, 2009); Quitinases de classe VI, que possuem um domínio de ligação à quitina com alto grau de identidade ao das quitinases de classe I e uma região C-Terminal similar à das quitinases de classe IV (Ponstein *et al.*, 1994); Quitinases de classe VII, cuja seqüência de aminoácidos possui alto grau de similaridade com as de quitinases de classe IV, porém carecendo do domínio de ligação à quitina na região N-terminal (Singh *et al.*, 2007).

Esse eclético grupo de moléculas indica pelo menos duas origens diferentes para o surgimento da atividade quitinolítica em plantas: o grupo que deu origem as Glicosil-hidrolases da família 18 (Quitinases de classe III e V); e o que deu origem as Glicosil-hidrolases da família 19 (Quitinases de classe I, II, IV, VI e VII). Tamanha heterogeneidade reflete a importância, para a defesa vegetal, do metabolismo de polímeros de *N*-acetilglicosamina, que compõem a quitina da parede celular de fungos e a membrana peritrófica do intestino dos insetos (Ryerse *et al.*, 1994), bem como a camada de peptídeoglicano (polímero de *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico unidos por uma malha de peptídeos) que compõe a parede celular de algumas bactérias (Kasprzewska, 2003).

Assim como as plantas lançam mão de enzimas hidrolíticas para lesionar a parede celular dos patógenos, estes também se utilizam do mesmo artifício para infectar a célula vegetal. Patógenos de plantas sintetizam celulasas, pectinases, mananases, xilanases, dentre outras enzimas, para degradar a parede celular vegetal. As plantas também devem estar preparadas para se defender desse ataque enzimático.

I.I.IV. Inibidores de enzimas que degradam a parede celular no contra-ataque da célula vegetal

A parede celular vegetal é composta por uma complexa malha de polissacarídeos hidrofóbicos, ligninas e proteínas, que têm como finalidade o suporte mecânico da célula vegetal, a proteção desta contra o ataque de patógenos, e a regulação do transporte de materiais (água e solutos) entre o citoplasma e o meio extra-celular (Wei *et al.*, 2009). Dentre os polissacarídeos que compõem a parede celular, os mais abundantes são a celulose (35-50%) e os polímeros de hemicelulose (20-35%) (Himmel *et al.*, 2007), que encontram-se imersos numa matriz de polissacarídeos não-celulósicos, dentre eles a lignina e a pectina. É a interação entre as fibras de lignina, hemicelulose e pectina que tornam a parede celular vegetal hidrofóbica e mais resistente a degradação enzimática (Davin & Lewis, 2005). A hemicelulose é composta por polímeros de glicomanana, xiloglucana e xilana (Jarvis, 2009), que, junto à celulose, são os principais alvos das enzimas hidrolíticas produzidas por fungos e bactérias para a degradação da parede celular vegetal (Camassola & Dillon, 2007).

Durante o processo de infecção as plantas iniciam uma contra-resposta sintetizando e secretando inibidores de enzimas que degradam a parede celular vegetal, como as xilanases, pectina metil-esterases, pectina liases e xilo-glucana endoglucanase. Diversos grupos de inibidores dessas enzimas são conhecidos, como os PMEI (Pectin Methyl-esterase Inhibitor), os PLIP (Pectin lyase Inhibitor Protein), os XEGIP (Xylogucan Endoglucanase Inhibitor Protein), os TAXI (*Triticum aestivum* Xylanase Inhibitor), os TL-XI (Thaumatococcus-like Xylanase Inhibitor) e os XIP (Xylanase Inhibitor Protein). Esses inibidores são conhecidos por inibirem enzimas de fungos e bactérias que degradam a parede celular de plantas, porém não afetam a atividade de xilanases vegetais. Alguns desses inibidores são considerados “Relacionados à Patogênese (PR)” enquanto outros podem agir como uma defesa basal pré-existente contra o ataque de patógenos. A expressão de alguns genes dessa família é significativamente induzida por fatores bióticos, como fungos fitopatogênicos; e abióticos como fitohormônios relacionados à defesa vegetal (ácido jasmônico) (Igawa *et al.*, 2004).

A evolução desses inibidores de enzimas que degradam a parede celular vegetal a partir de proteínas PR pré-existentes indica uma corrida armamentista molecular na interação planta-patógeno. Os intrincados mecanismos de dobramento molecular e inibição enzimática por mimetismo do substrato são indicativos de como os genes podem adquirir novos padrões de expressão e de como as proteínas podem adquirir novas funções. Os processos de evolução molecular que levam à diversificação bioquímica da célula serão apresentados no tópico a seguir.

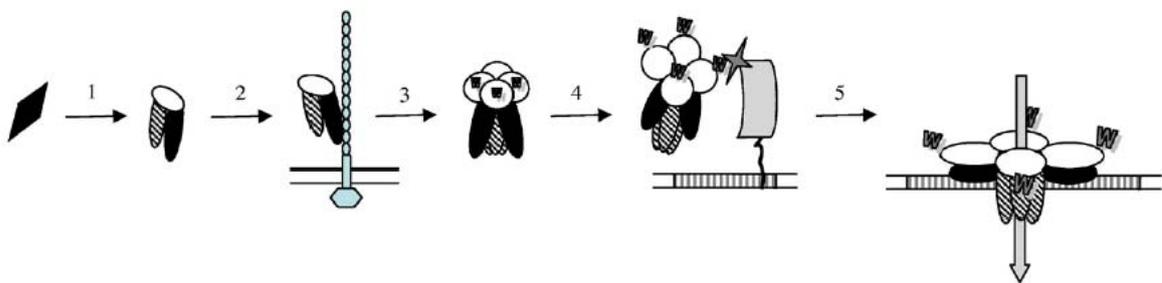
I.I.V. Defesa externa: bactérias entomopatogênicas – *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria gram-positiva esporulante que forma inclusões protéicas paraesporais durante a fase estacionária do seu crescimento. O nicho ecológico dessa bactéria pode variar da superfície de folhas ao solo, sendo que ela é freqüentemente encontrada em cadáveres de insetos. Sua atividade entomotóxica é conferida por proteínas que compõem os cristais paraesporais (Toxinas Cry), embora seja sabido que outros compostos extracelulares, como fosfolipases (Bednarczyk & Kozon, 2008), β -exotoxinas (Efimtsev *et al.*, 2002), Proteínas Inseticidas Vegetativas (Vegetative Insecticidal Proteins - VIPs) (Lee *et al.*, 2003) e glicosil hidrolases como quitinases (Brar *et al.*, 2008), também contribuem para a sua atividade inseticida.

Em 1989, Höfte e Whiteley revisaram os genes *cry* conhecidos e propuseram uma nomenclatura sistemática para estes genes (Höfte & Whiteley, 1989). Desde então o número de genes de proteínas Cry cresceu de 14 para mais de 300, e em 1998 Crickmore e colaboradores propuseram uma revisão da nomenclatura para acomodar os novos dados de seqüências. Atualmente as proteínas Cry compreendem pelo menos 50 subgrupos com mais de 200 membros com pesos moleculares variando de 65 a 140 kDa.

O mais aceito mecanismo de ação das toxinas Cry é o proposto por Bravo, onde os insetos (ou larvas) ingerem esporos e cristais em suspensão na água e, no trato digestivo, sob a ação do pH alcalino e de proteases intestinais, as protoxinas encontradas nos cristais são solubilizadas e ativadas. Dessa maneira as toxinas liberadas ligam-se à receptores no topo das microvilosidades das células do epitélio intestinal causando alterações citopatológicas e matando o inseto (Figura 2) (Bravo *et al.*, 2007). Desde a década de 1930, formulações de esporos e cristais de *Bt* são utilizadas no controle de pragas agrícolas (Federici, 2005).

Além das toxinas Cry muitas cepas de *B. thuringiensis* produzem proteínas tóxicas durante a fase vegetativa do seu crescimento, isto é, antes do processo de esporulação, quando os cristais contendo as toxinas Cry são formados. Essas proteínas são conhecidas como Proteínas Inseticidas Vegetativas (VIPs), e são tóxicas para algumas ordens de insetos, principalmente a Lepidoptera (Rivera *et al.*, 2004). O Mecanismo de ação dessas



**Fonte: Bravo, A. (2007), Toxicon*

Figura 2: Modelo de ação das toxinas Cry. (1) Solubilização e ativação da toxina; (2); Ligação das toxinas monoméricas a um primeiro receptor, que induz uma modificação conformacional na toxina; (3) Formação de um oligômero; (4) Ligação da toxina oligomérica a um segundo receptor, que acarreta uma nova modificação conformacional; (5) inserção da toxina oligomérica na membrana celular e formação de poro.

proteínas inclui ligação em sítios específicos na superfície do epitélio do trato digestivo, sítios estes que não são os mesmos das toxinas Cry, levando a formação de poros cátion-específicos que geram um desbalanceamento eletrolítico e levam a paralisia e morte do inseto (Lee *et al.*, 2006).



I.II. EVOLUÇÃO MOLECULAR NA INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA

I.II.I. Como os genomas evoluem?

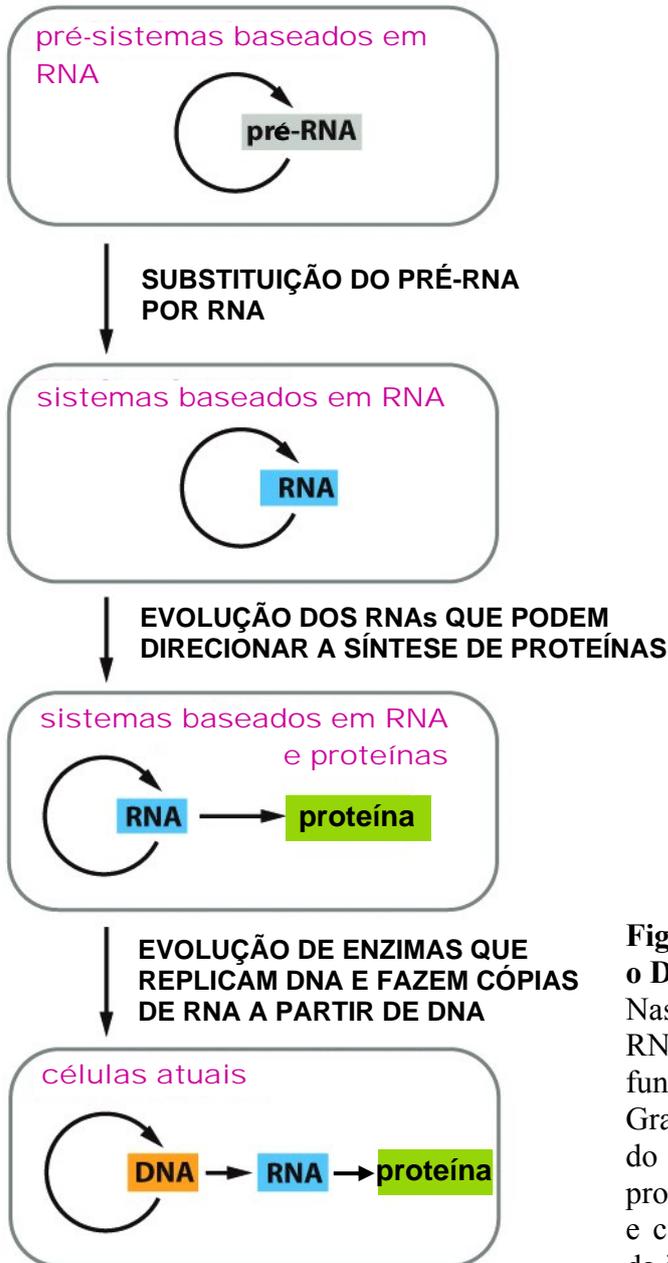
Processos de evolução molecular pré-bióticos levaram ao surgimento de uma molécula replicante primitiva, que hoje acredita-se ter sido um ancestral dos atuais Ácidos Ribonucléicos (RNAs). Tais moléculas centralizavam em si as duas funções básicas dos sistemas biológicos: i) manutenção da informação genética a ser replicada e ii) capacidade de catalisar reações químicas. Aquele era o antigo e famoso “Mundo de RNA” (*RNA World*) (Orgel, 2000; Spirin, 2005). Em algum momento nos primórdios da evolução biológica, esse replicante primitivo sofreu um processo de celularização ao ser envolvido por um invólucro lipídico anfipático. A celularização foi um dos grandes marcos no processo de evolução biológica.

I.II.I.I. Da bioquímica pré-biótica aos genomas, pelo mundo de RNA

É fácil imaginar algumas vantagens que a celularização tenha trazido a vida que surgia; o volume restrito pelo invólucro lipídico aumentava a probabilidade de que determinadas reações acontecessem e os produtos dessas reações encontravam-se protegidos da degradação imposta pelo meio exterior. Os mecanismos de evolução pré-biótica que levaram a celularização da molécula replicante ancestral, bem como os eventos posteriores que levaram ao surgimento de uma estrutura proto-celular estável, ainda são difíceis de imaginar até mesmo pelos teóricos mais sagazes da evolução molecular (De Duve, 2009). Porém há um consenso de que, após a estabilização do proto-metabolismo celular, a estrutura genético-bioquímica daquela forma de vida primitiva sofreu seu primeiro processo de diferenciação bioquímica. A molécula replicante ancestral, aquele RNA mantenedor da informação genética e capaz de catalisar reações químicas, aos poucos foi sendo substituído em suas funções por novas moléculas mais estáveis e eficientes nos papéis a serem realizados. Primeiramente a catálise das reações químicas ficou a cargo de polipeptídeos. Naquele momento, moléculas de RNA catalisavam a formação de

ligações peptídicas ao acaso, pois o código genético ainda não teria evoluído. A catálise da formação das ligações peptídicas por ribonucleotídeos foi um passo tão crucial no desenvolvimento da bioquímica celular que essa reação continua acontecendo até hoje, em todas as células, na subunidade maior dos ribossomos, como um testemunho de um acontecimento histórico na evolução bioquímica. Atualmente, ribozimas artificiais capazes de catalisar reações de aminoacilações, ligando um aminoácido a um RNA transportador específico, nos permite especular como um primitivo código genético teria evoluído, tendo como molde uma seqüência linear de RNA fita simples (Alberts, *et al.*, 2008). Naquele momento a história da breve vida começava a adentrar o “Mundo de RNA-Proteínas” (Figura 3), e um código genético, que relacionava a seqüência de ribonucleotídeos de um RNA com a seqüência de um polipeptídeo codificado por ele, estava prestes a surgir.

Uma das evidências que aponta o RNA como precursor do DNA como mantenedor da informação genética vem do açúcar que compõem esses dois ácidos nucléicos. A ribose, presente no RNA, assim como a glicose e outros açúcares simples, pode ser facilmente produzida a partir de formaldeído, um elemento bastante comum nos primórdios do nosso planeta. Em contrapartida a desoxiribose, componente do DNA, é um pouco mais complicada de se obter, e nos sistemas biológicos atuais esse açúcar só é produzido a partir de uma ribose pré-existente, com auxílio de enzimas que retiram o oxigênio da hidroxila ligada ao carbono 2 da ribose (Figura 4). Essa dependência sugere que ácidos nucléicos compostos por desoxriboses só devam ter surgido após os peptídeos terem tomado as rédeas das catalises enzimáticas nos sistemas bioquímicos primitivos. A hidroxila no carbono 2 da ribose faz do RNA uma molécula muito instável, altamente reativa (hoje sabemos que essa hidroxila participa de algumas reações, como as de *autosplicing* dos íntrons (Alberts *et al.*, 2008; Nelson & Cox, 2008). Dessa forma não é difícil imaginar a pressão evolutiva que pudesse levar ao surgimento de uma enzima especialista em retirar oxigênio das hidroxilas ligadas ao carbono 2 das riboses dos RNAs primitivos que ao longo de gerações substituiria as seqüências de RNA codificantes de peptídeos por DNA, uma molécula mais estável. Certamente, durante a transição do Mundo de RNA para o Mundo de DNA alguns replicantes primitivos devem ter experimentado formas de hibridismo, alguns ácidos nucléicos poderiam ser formados por riboses intercaladas com desoxiriboses, outros poderiam ser formados por fitas antiparalelas de DNA e RNA, que por algum motivo não se separaram durante os processos de replicação. Este primitivo erro replicativo foi um outro grande marco na história da evolução molecular. Um ácido nucléico em fita-dupla trás consigo, além da informação para a síntese de proteínas, um “*back-up*” da informação que pode ser acessado quando a célula detectar algum erro na mensagem a ser lida.



*Modificado de Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008).

Figura 3: A hipótese de que o RNA precede o DNA e as proteínas na evolução molecular. Nas células primitivas, moléculas ancestrais ao RNA (Pré-RNA) poderiam ter combinado as funções genéticas, estruturais e catalíticas. Gradualmente o RNA assumiu essas funções do proto-metabolismo. Nas células atuais as proteínas desempenham as funções estruturais e catalíticas, enquanto o DNA é o repositório da informação genética.

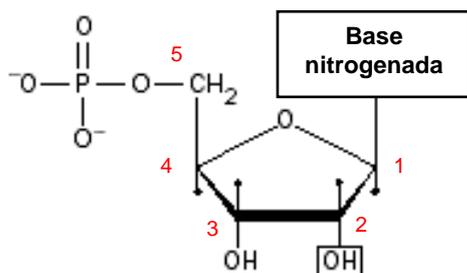


Figura 4: Estrutura elementar de um ribonucleotídeo componente do RNA. Os cinco carbonos da ribose encontram-se discriminados em vermelho. Nas desoxiriboses que compõem o DNA a hidroxila ligada ao carbono 2 é substituída por um hidrogênio.

Esse erro poderá então ser reparado de acordo com informação contida na fita complementar. Novamente, devido às vantagens oferecidas pelo novo replicante estável (DNA) com sua estrutura em fita-dupla, a história da vida entrou no capítulo do nosso Mundo de DNA¹. Mais tarde a substituição da base nitrogenada uracila (U), presente nos nucleotídeos que compõem o RNA, pela timina (T), encontrada atualmente apenas nos DNAs, foi consequência da mesma pressão evolutiva que selecionava a estabilidade da manutenção da informação genética no novo replicante.

Muitos nucleotídeos sofrem uma perda espontânea dos seus aminogrupos exocíclicos (desaminação). Citosinas desaminadas convertem-se em uracilas (Figura 5) numa taxa que chega a uma citosina desaminada em cada 10⁷ citidinas (nucleotídeo que carrega citosina) em 24 horas, o que corresponde a 100 desaminações por dia numa célula de mamífero (Nelson e Cox, 2008). Caso o DNA mantivesse a uracila na sua composição, a integridade da informação genética seria prejudicada não só pela alta taxa de mutação, mas também por dificultar os processos de reparo. “*Como a célula primitiva distinguiria uma uracila que realmente faria parte da informação genética, daquela que foi gerada por uma citosina desaminada?*”. Certamente a substituição de U por T, no DNA, ocorreu após a transição do mundo de RNA para o mundo de DNA, quando esta última molécula já era a responsável pela manutenção da informação genética. O RNA, que não mais precisava se ocupar de tal cargo, continuou com suas uracilas até hoje.

Os confiáveis genomas de DNA fita-dupla surgiram então na história da vida. Certamente eram genomas bem pequenos, capazes de codificar toda a informação necessária para a construção e manutenção das células primitivas que, mais tarde, dariam origem aos organismos dos três domínios conhecidos hoje: *bacteria*, *archea* e o nosso *eucharya*. Os atuais organismos do domínio *eucharya*, possuem genomas enormes, como o genoma de mais de 3 bilhões de pares de bases nitrogenadas dos humanos. Porém, segundo a teoria evolucionista Darwiniana, os genomas complexos e grandes atuais se desenvolveram a partir dos genomas simples e pequenos dos primeiros organismos celulares, cujos semelhantes mais próximos vivos hoje são as bactérias como a *Escherichia coli*, que possui um genoma com pouco mais que 4,5 milhões de pares de bases. Certamente os genomas das proto-células eram ainda menores. Tal

¹ Recentemente a descoberta de vias para a regulação da expressão gênica e defesa celular baseadas em RNAs não-codificantes chamou a atenção da comunidade científica para os conhecidos RNAs, que desde os primórdios da biologia molecular moderna eram moléculas subestimadas, cujos papéis no metabolismo celular eram tidos apenas de intermediários entre a informação genética contida no DNA e a expressão dessa informação na forma de proteínas. A descoberta das vias de RNA interferente (Hannon, 2002) e dos pequenos RNAs nucleares (Matera *et al.*, 2007) geraram um novo paradigma na biologia, como se um novo velho mundo de RNA estivesse sendo redescoberto.

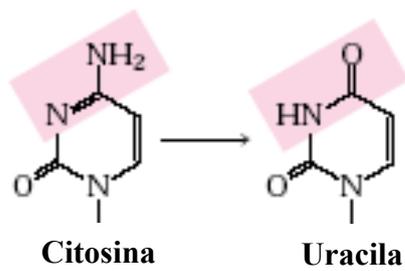


Figura 5: Conversão de uma citosina em uracila por desaminação. Esta reação ocorre espontaneamente e a uracila resultante é prontamente reconhecida como um produto de mutação e removida pelos sistemas de reparo do DNA. Em primitivos genomas de RNA tal erro não seria detectado tão facilmente.

observação levanta uma questão fundamental: “*Como, ao longo do processo de evolução e especiação, os genomas cresceram?*”, visto que o processo de replicação do DNA, que ocorre antes de toda divisão celular, primordialmente visa apenas à cópia daquela molécula e não a sua extensão?

Hoje conhecemos bem alguns processos moleculares que podem levar a pequenas ampliações nos genomas, entre eles, a duplicação e divergência de genes, um dos principais fatores a levar a um aumento do genoma de acordo com o aumento da complexidade dos organismos. Acredita-se hoje que todos os genes atuais descendam – via processos de duplicação, divergência e rearranjo de segmentos – de uns poucos genes ancestrais que existiam nas formas primitivas de vida (Alberts *et al.*, 2008). Processos como este, ao acontecerem, promovem variações bioquímicas na célula, podendo gerar alterações no fenótipo que sofrerá com as pressões da seleção natural para a eliminação ou perpetuação. Com o passar das gerações, essas pequenas ampliações podem resultar em genomas com bilhões de pares de bases divididos em dezenas de cromossomos. Tudo de que a vida precisa para isso é tempo e chance de errar.

I.II.I.II. Erros de disjunção e rearranjos não balanceados na meiose

Erro de não-disjunção é o nome dado a um fenômeno caracterizado pela separação incorreta dos cromossomos homólogos durante a meiose. O resultado disso é que um dos gametas haplóides produzidos carece de um dos cromossomos, enquanto o outro possui um cromossomo a mais. Em mamíferos esse tipo de aneuploidia² é bastante comum, acontecendo em 5% das gestações de humanos, porém geralmente é incompatível com a vida. Espécimes com apenas parte de um cromossomo a menos ou a mais são mais viáveis, e esse tipo de variação acontece devido a *rearranjos não balanceados* durante o *crossing-over* da meiose (Nussbaum *et al.*, 2008). Animais são mais sensíveis a variações no número de cromossomos, sejam aneuploidias ou poliploidias³. Em contrapartida plantas são mais tolerantes a esses eventos. Estimativas apontam que 30-80% das espécies de plantas existentes hoje são poliplóides, algumas delas possuindo um genoma composto pela fusão de diversos genomas de espécies relacionadas. Em plantas a poliploidia é considerada um dos principais fatores de especiação (Wood *et al.*, 2009), para tanto, foi necessária a evolução de intrincados mecanismos

² Quantidade anormal de cromossomos em um cariótipo devido a um cromossomo extra ou a falta de um deles. Geralmente associada a mal formações físicas.

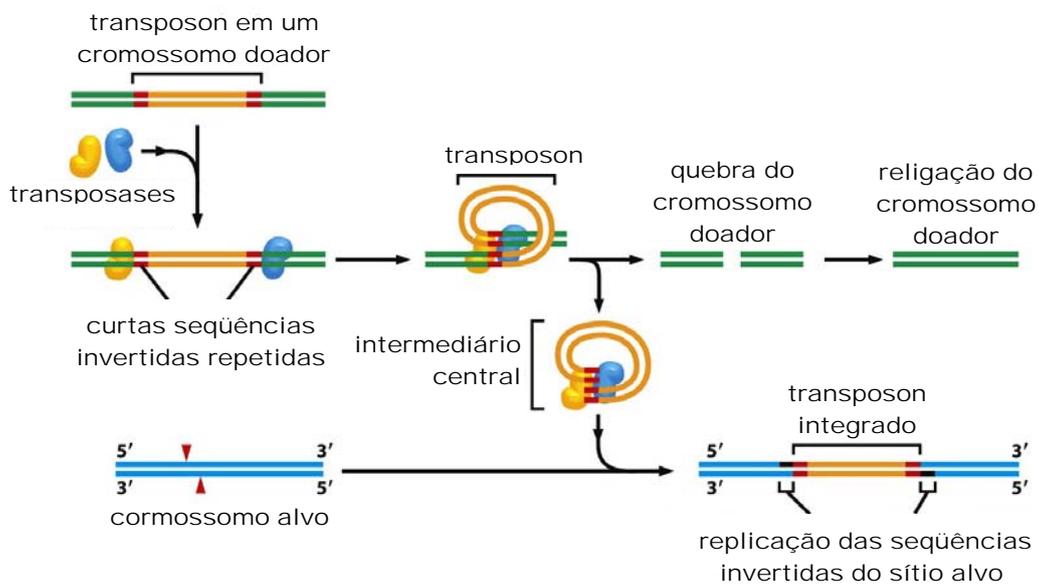
³ Variações em múltiplos exatos do número haplóide (n) de um organismo, ex.: 2n (diplóide), 3n (triplóide), 4n (tetraplóide). Geralmente gerada por fusão de gametas não reduzidos (2n).

de compensação para aliviar o desbalanceamento gênico causado pela multiplicação de genomas (Edger & Pires, 2009).

I.II.I.III. Elementos Genéticos Transponíveis (Transposons), infecções virais e transferência genética horizontal.

Transposons são seqüências de DNA capazes de se mover, ou “saltar”, de um sítio em um cromossomo (sítio doador) para outro sítio no mesmo cromossomo ou em um cromossomo diferente (sítio alvo). Transposons são encontrados em todos os organismos e, dependendo de sua estrutura e do mecanismo de transposição, serão classificados de diferentes formas (ex: Transposons simples: contêm apenas a seqüência requerida para transposição e genes codificadores das enzimas (transposases) que promovem o processo; Transposons compostos: Contêm um ou mais genes além daqueles necessários para o evento de transposição). O processo de transposição pode acontecer de forma direta (Transposição Direta), quando as transposases fazem cortes nas seqüências que flanqueiam os transposons excisando-os do sítio doador e inserindo-os entre um novo corte realizado no sítio alvo; ou de forma replicativa (Transposons Replicativos), quando durante o processo de inserção no sítio alvo o transposon inteiro é replicado (para maiores detalhes sobre os tipos de elementos genéticos transponíveis e seus mecanismos de transposição, ver Nelson & Cox, 2008). Em todos os tipos de transposição a replicação do sítio alvo é constante, pois os cortes realizados pelas transposases geram sempre extremidades coesivas no sítio alvo, enquanto que o mecanismo de excisão gera extremidades cegas nos transposons, que se ligam diretamente apenas às extremidades protuberantes dos sítios alvos. Sendo assim as extremidades retraídas daqueles sítios devem ser alongadas e ligadas ao transposon (Figura 6). As regiões replicadas no sítio alvo permanecerão como uma “cicatriz” naquele sítio mesmo quando, centenas de gerações depois, aquele transposon realizar mais um evento de transposição. Eventos de transposição são extremamente raros, por exemplo: estima-se que a razão de transposição do transposon *Alu*, do qual existem hoje 1 milhão de cópias no genoma humano, é de uma em cada 150 nascimentos (Deininger & Daniels, 1986).

Ao longo das gerações as transposições genéticas contribuíram muito para o crescimento dos genomas, seja pela replicação do elemento genético em si, seja pela duplicação dos sítios alvo. Só para citar um exemplo, 40% do genoma humano hoje é constituído por seqüências relacionadas a elementos genéticos transponíveis ou suas “cicatrices” (Alberts *et al.*, 2008).



*Modificado de Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008).

Figura 6: Evento de transposição direta com replicação do sítio de alvo. Os transposons são reconhecidos pelas transposases através da interação destas com os sítios de transposição (*vermelho*). Transposases catalisam a excisão do transposon gerando extremidades cegas e em seguida inserem-no no sítio alvo clivando-o e gerando extremidades coesivas. Durante a integração a extremidade da fita retraída do sítio alvo deve ser amplificada (*azul escuro*) ligada ao transposon.

Infecções virais podem transcorrer por duas vias: i) Via lítica, quando após infectar a célula e integrar seu genoma ao do hospedeiro o genoma viral já inicia a síntese das moléculas responsáveis pela sua replicação e se propaga para o meio extracelular ou para outras células; ii) Via profágica, quando o vírus apenas integra o seu genoma ao genoma hospedeiro e aguarda algum sinal (estresse físico ou químico) para iniciar o ciclo lítico (Rockney *et al.*, 2008). Gerações podem se passar até que vírus latentes nos genomas iniciem seus ciclos líticos. Segundo dados do Projeto Genoma Humano, 8% do genoma humano compreende seqüências de transposons evolutivamente relacionados a vírus (*retroviruslike* transposons) (Nelson & Cox, 2008).

Transferência genética horizontal acontece quando parte de um genoma é transferido para outro genoma, mesmo sendo este outro genoma de uma espécie diferente. A transferência genética horizontal é bastante comum em procariotos, sendo por essa via que genes de resistência a antibióticos ou genes codificadores de toxinas, freqüentemente encontrados no DNA plasmidial, podem ser transmitidos entre linhagens de bactérias, por exemplo: as bactérias do gênero *bacillus* são praticamente indistinguíveis geneticamente quando considerado apenas o DNA cromossomal, sendo o DNA plasmidial o responsável pela diferença entre as espécies *B. cereus* (patógenos humano), *B. anthracis* (produtor de proteínas tóxicas para mamíferos) e *B. thuringiensis* (produtor de proteínas tóxicas para insetos). Na natureza ou em laboratório uma dessas espécies pode ser convertida em uma das outras por troca de DNA plasmidial (Rasko *et al.*, 2005). A transferência genética horizontal de procariotos para eucariotos é um fenômeno um pouco mais raro, porém bem relatado no tocante aos genes mitocondriais e plastidiais encontrados no genoma nuclear dos eucariotos (Kleine *et al.*, 2009). A existência de um grande número de genes codificadores de enzimas que degradam a parede celular vegetal em fitonematóides também é creditada a eventos de transferência genética horizontal entre bactérias e nematóides (Abad *et al.*, 2008).

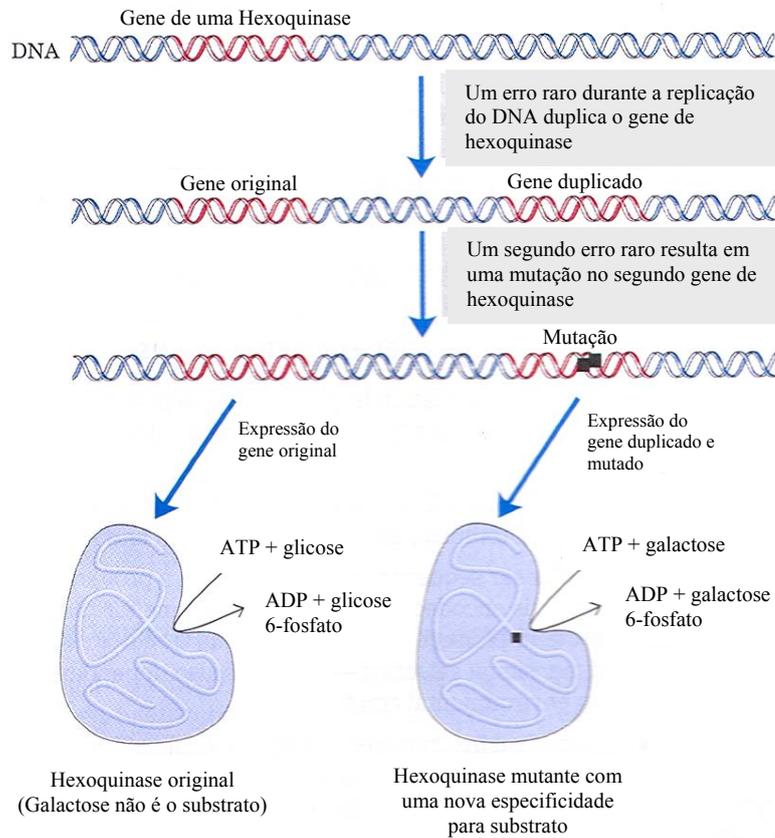
I.II.I.IV. Falhas no mecanismo natural de replicação e manutenção do DNA

Erros nos processos de replicação, recombinação e reparo do DNA podem levar a alterações simples na seqüência de nucleotídeos, como substituições de bases, inversões, deleções e duplicações de seqüências. Quando genomas de duas espécies filogeneticamente distintas são comparados, como o genoma de um roedor com o de um peixe, raramente são

encontrados genes num organismo que não tenham homólogos⁴ no outro. Genes sem homólogos são raros na natureza, em contrapartida freqüentemente são encontradas famílias multigênicas que possuem diferentes números de membros em diferentes espécies. Para a formação dessas famílias os genes devem sofrer sucessivos processos de duplicação, o que permite que as cópias excedentes sejam selecionadas para a realização de novas funções, divergindo entre si, sem que a função do gene ancestral seja afetada (Figura 7). Duplicações de segmentos de genomas ocorrem com alta freqüência em todas as linhagens evolutivas. Em um estudo sobre duplicações cromossômicas em leveduras, duplicações de 50.000 à 250.000 pares de bases foram comumente encontradas, muitas das quais eram repetições em tandem (Figura 8) (Koszul *et al.*, 2004). Duplicações de genomas inteiros são um exemplo dramático do ciclo “duplicação-divergência” de genes, e isso pode ocorrer de uma maneira muito simples: tudo do que se precisa é de um ciclo de replicação do genoma numa linhagem de célula germinativa sem que haja divisão celular. Inicialmente o número de cromossomos dobrará e todos os genes daquele genoma existirão em duplicata permitindo então o surgimento e seleção de mutações. Estima-se que eventos de duplicação no genoma da soja tenham ocorrido entre 59 e 13 milhões de anos atrás, resultando no genoma atual onde aproximadamente 75% dos genes da soja existem em múltiplas cópias (Schumtz *et al.*, 2010).

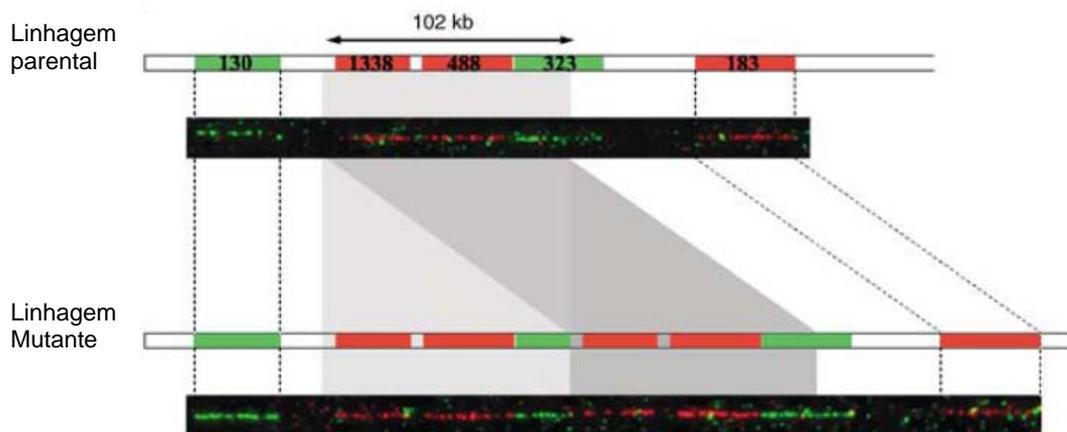
Independente do modo pelo qual um genoma qualquer tenha crescido, se esse processo tiver produzido mais de uma cópia de um mesmo gene, isso será tudo o que a natureza precisará para que a estrutura genética se diversifique sem que a função ancestral seja eliminada. Contudo, é importante distinguir esse processo da divergência genética que ocorre quando uma espécie gera duas novas espécies diferentes. Neste caso, os genes das novas espécies gradualmente se tornarão diferentes, porém muitos deles continuarão desempenhando as mesmas funções nas diferentes espécies. Genes relacionados dessa maneira, isto é, genes com a mesma função, encontrados em duas espécies distintas que descendem de um mesmo ancestral, são denominados genes *ortólogos*. Já genes encontrados em um mesmo genoma e que foram gerados por duplicação gênica, se estes divergirem a ponto de desempenharem funções distintas naquele organismo, serão então denominados *parálogos* (Alberts *et al.*, 2008).

⁴ Homologia entre genes é representada por certo grau de identidade na seqüência de nucleotídeos. Genes homólogos são aqueles gerados pela duplicação de um gene ancestral e que com o passar das gerações foram divergindo um do outro por mutações ao acaso. Quanto maior o grau de identidade entre a seqüência de nucleotídeos de genes homólogos, menor foi o tempo transcorrido a partir do momento no qual o gene ancestral se duplicou e os genes resultantes iniciaram o processo de divergência.



* Modificado de Nelson & Cox. *Lehninger – Principles of Biochemistry* (© Freeman 2008).

Figura 7: Duplicação e mutação de genes: uma via para a geração da diversidade bioquímica. Um único gene em um organismo hipotético pode ocasionalmente, por acidente, ter sido copiado duas vezes durante a replicação do DNA. Após diversas gerações, com o DNA contendo dois genes de hexoquinase sendo replicado repetidamente, novos erros podem ocorrer no gene adicional alterando a sua seqüência de nucleotídeos e conseqüentemente alterando também a proteína codificada por ele. Um erro raro pode levar a proteína codificada pelo gene mutado a desempenhar uma nova função.



**Modificado de Koszul, R. (2004), The EMBO Journal*

Figura 8: Organização em tandem de um segmento intracromossomal de levedura duplicado. As regiões em vermelho e verde correspondem aos sítios de hibridização para sondas marcadas com biotina e digoxigenina respectivamente.

Os conceitos de genes ortólogos e parálogos são de especial importância para a predição da função gênica a partir de seqüências de genes depositadas em bancos de dados. Por exemplo: se um pesquisador procura por um gene codificador de uma xilanase no genoma do fitonematóide *Meloidogyne incognita*, certamente ele estará procurando por um gene ortólogo a genes de xilanases. Ao encontrar o gene elegível, o pesquisador ainda estará sob severo risco de ter encontrado não um gene de xilanase, mas sim um gene parálogo àquele ortólogo de xilanase que ele procurava. Se a divergência paralógica tiver ocorrido há pouco tempo, pode ser bem difícil reconhecer o gene elegível como parálogo, assim, certamente os responsáveis pela anotação do genoma de *M. incognita* não atentariam para uma recente sutil variação paralógica e anotariam aquele gene como uma xilanase mesmo. Passando isso despercebido, o pesquisador que procurava por genes de xilanases, se não atentar para sutis variações na seqüência primária da proteína codificada pelo gene elegível, poderá gastar tempo e dinheiro na clonagem de um gene cuja proteína codificada não apresentaria a atividade desejada.

Os mecanismos para a diversificação molecular inter e intraespecíficos são muitos, são bem conhecidos e são, inclusive, manipuláveis. A vida, desde seu início, só pôde se proliferar e recobrir todo esse pequeno planeta devido a capacidade de variação, que ao longo de gerações lhe permitiu mudar de hábitos e forma. Essa capacidade de variação mostra-se elegante quando observada sob a ótica da interação molecular entre plantas e pragas. O que será apresentado no tópico seguinte.

I.II.II. Evolução dos genes de resistência em plantas

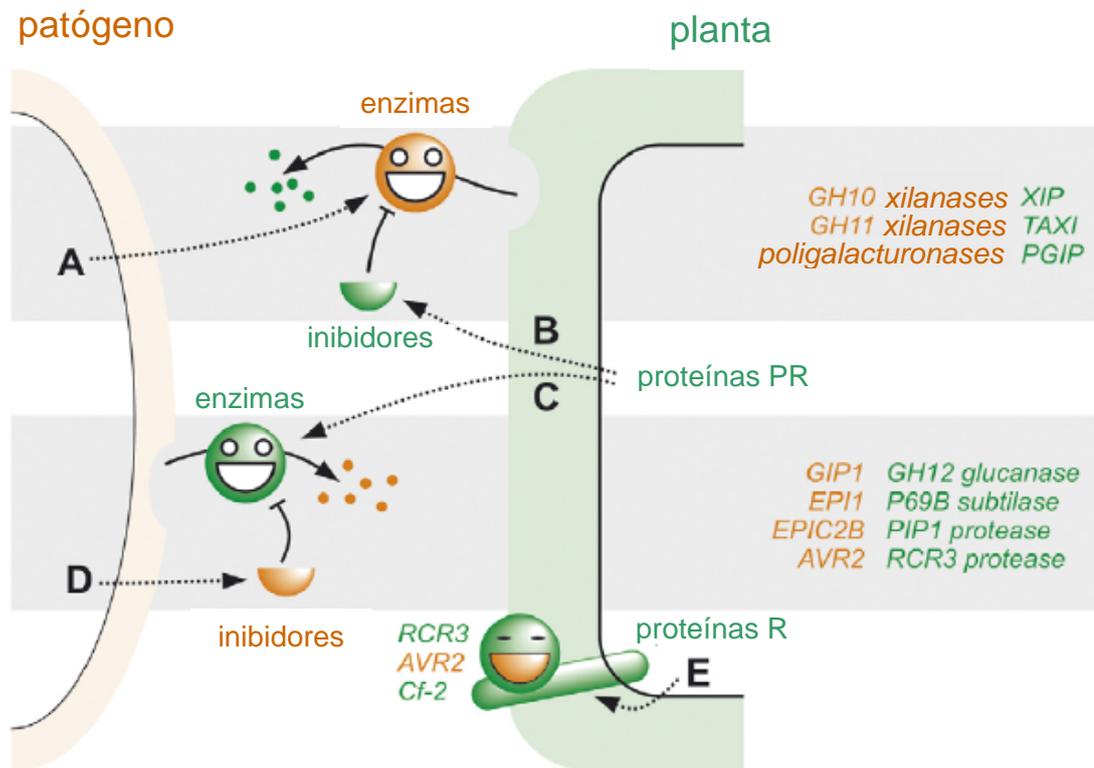
A superfície de uma planta transforma-se num verdadeiro campo de batalha bioquímico durante o ataque de um patógeno. Ali enzimas hidrolíticas estão prontas para atacar o inimigo, seja ele a célula vegetal que deva ser invadida, seja a célula de um fungo invasor que deva ser detido. Além disso, inibidores de enzimas hidrolíticas são também produzidos por ambas as partes como um escudo de proteção. Este jogo de ataque e contra-ataque envolve mais que enzimas hidrolíticas e inibidores, compondo um complexo mecanismo em “zig-zag” que gera uma “corrida armamentista” entre as plantas e os patógenos (Salvaudon *et al.*, 2008). Segundo Misas-Villamil, a interação extra-celular entre planta e patógeno pode ser simplificada assumindo que ela evoluiu pelos seguintes estágios: i) microrganismos se tornam patógenos por atacarem a parede celular vegetal utilizando enzimas que degradam a parede celular, ou outras enzimas hidrolíticas; ii) em resposta as plantas secretam inibidores para suprimir a ação das

hidrolases dos proto-patógenos; iii) além da supressão, um mecanismo de contra-ataque evoluiu nas plantas, que passam a produzir enzimas hidrolíticas que têm como alvo a parede celular dos proto-patógenos; iv) em contrapartida esses microrganismos produzem inibidores que afetam a ação das enzimas produzidas pelas plantas; v) como um último passo há a evolução, nas plantas, de um complexo e refinado sistema de reconhecimento do patógeno baseado nos genes de resistência (Genes R), que identificam alvos na célula vegetal manipulados pelos patógenos e induzem uma severa resposta de defesa que inclui a morte celular (Figura 9) (Misas-Villamil & van der Hoorn, 2008).

A pressão evolutiva em um sistema como esse é tamanha que hoje é possível avaliar a evolução de genes de resistência quando comparados a outros genes que evoluem sem a pressão exercida pela “corrida armamentista” típica do modelo em “zig-zag”. Recentemente Moeller e Tiffin mostraram que, dentre 17 genes relacionados à patogênese em duas espécies de milho, dois deles apresentavam evidências de seleção positiva, enquanto os outros 15 possuíam um padrão de evolução neutro (Moeller & Tiffin, 2005). Ao avaliar cinco genes de inibidores de proteínases em duas espécies do gênero *Populus* (*P. balsamifera* e *P. tremula*), Neiman e colaboradores identificaram diversos mecanismos de evolução como seleção positiva e constrição seletiva relaxada, que levaram a divergência desses inibidores dentro de uma única espécie e entre as duas espécies analisadas (Neiman *et al.*, 2009). Ao longo do processo de domesticação do milho, genes de quitinases foram alvos de intenso processo de evolução por seleção positiva, o que explica a diversidade desse grupo de moléculas naquela espécie (Wright, 2005). O mesmo foi observado nos mais de 300 membros de uma família de defensinas de *Arabidopsis thaliana*, cuja divergência genética também foi explicada pelo processo de seleção positiva direcionada pelo patógeno (Silverstein *et al.*, 2005).

I.II.II.I. De quitinases à inibidores de xilanases

A força da seleção positiva sobre as moléculas que atuam na interação planta-praga, além de aprimorar funções pela seleção de variantes moleculares mais reativas, também influenciam o surgimento de novas funções em proteínas codificadas por cópias de um mesmo gene que iniciaram o processo de divergência por paralogia. Um caso clássico que ilustra essa colocação é o do surgimento da atividade inibitória de enzimas xilanásicas entre as quitinases de Classe III de plantas.

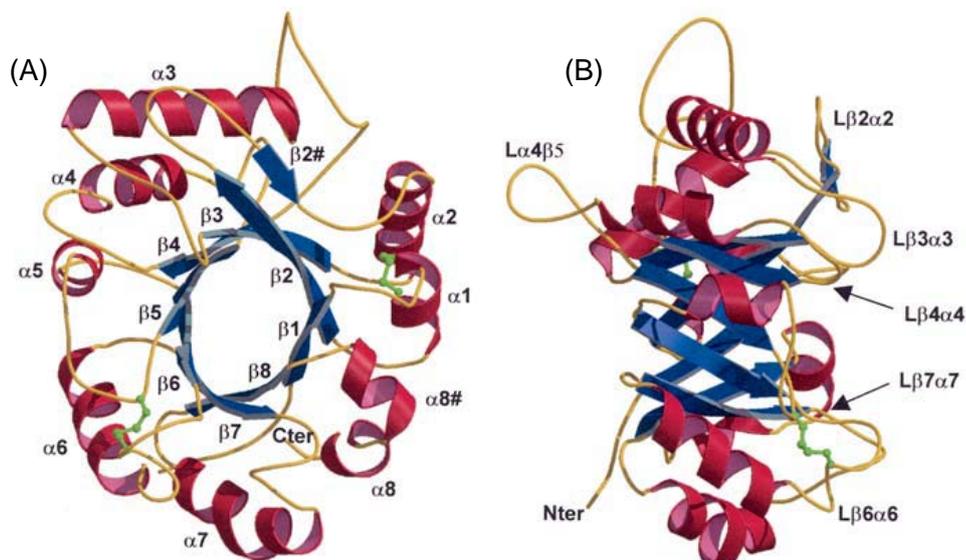


*Modificado de Misas-Villamil, J.C. & van der Hoorn, R.A.L. (2008), *Current Opinion in Plant Biology*

Figura 9: Evolução da interação molecular planta-patógeno em cinco estágios. (A) Patógenos atacam a parede celular vegetal usando enzimas que degradam a parede celular; (B) plantas secretam inibidores que suprimem a atividade das hidrolases secretadas pelos patógenos; (C) Plantas secretam hidrolases (proteínas PR, glucanases, quitinases e proteases) que degradam componentes do patógeno; (D) patógenos secretam inibidores que suprimem a atividade das hidrolases de plantas; (E) Proteínas R detectam a manipulação das proteínas vegetais pelo patógeno e desencadeiam uma resposta mais efetiva que pode incluir a morte celular. Exemplos do papel exercido pelas moléculas designadas à direita na interação planta-patógeno são descritos em Misas-Villamil & van der Hoorn, 2008.

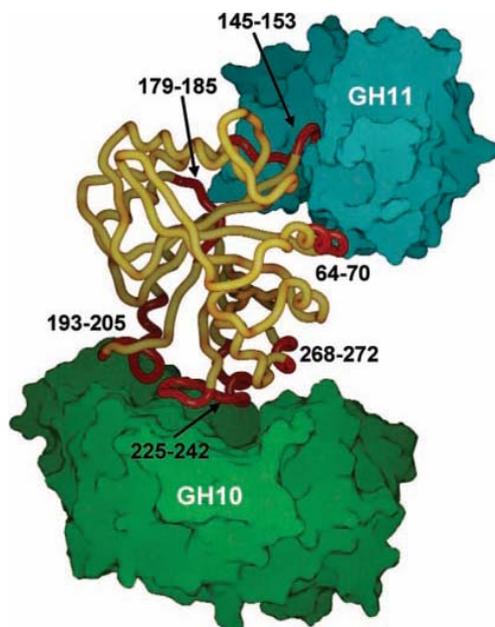
Ao final dos anos 1990, a atividade inibitória para xilanases foi constatada em preparados de farinha de trigo (Debyser *et al.*, 1997) sendo mais tarde atribuída a um inibidor proteínico (Rouau & Surget, 1998). O gene para o inibidor de xilanases proteínico, XIP-I (*Xylanase Inhibitor Protein I*), foi clonado (Elliott *et al.*, 2002) e logo se constatou que a seqüência de aminoácidos predita a partir da seqüência de nucleotídeos clonada exibia alta similaridade com quitinases de classe III da família 18 das Glicosil Hidrolases (GH18). A determinação da estrutura tridimensional por difração de raios-X confirmou a topologia $(\beta/\alpha)_8$ típica das GH18 (Figura 10) (Payan *et al.*, 2003). Contudo, uma análise mais detalhada mostrava diferenças significantes na região homóloga àquela correspondente ao sítio ativo das verdadeiras quitinases de classe III, como a Hevamina (Scheltinga *et al.*, 1994). Na Hevamina e em outras quitinases de classe III, um ácido glutâmico conservado no sítio catalítico doa prótons para o oxigênio envolvido na ligação entre os resíduos de *N*-Acetilglicosamina nos primeiros estágios da catálise. Nas proteínas pertencentes à família GH18 e que sabidamente não apresentam atividade quitinásica, como a Concanavalina-B e Narbonina, o ácido glutâmico catalítico é substituído por uma glutamina (Henning *et al.*, 1995; Payan *et al.*, 2003). Ensaios de mutação sítio dirigida também confirmaram a importância deste e de outros resíduos envolvidos no mecanismo de catálise das quitinases de classe III de plantas (Papanikolau *et al.*, 2001). Interessantemente, XIP-I, apesar de possuir o ácido glutâmico catalítico na posição conservada, não apresenta atividade quitinásica (McLauchlan *et al.*, 1999). Davies e colegas justificaram essa observação de duas maneiras: i) propondo um engajamento da cadeia lateral do ácido glutâmico catalítico em pontes de sal com dois resíduos de arginina próximos que o impediriam de atuar como doador de prótons (Davies *et al.*, 1997) e, ii) considerando que a cadeia lateral da Tyr-80 bloquearia o acesso do substrato ao sítio ativo.

A alta similaridade topológica e entre as seqüências primárias das XIP e das quitinases de classe III de plantas sugerem que elas tiveram uma origem evolutiva comum, e que o processo de divergência entre os genes duplicados começou há pouco tempo (Durand *et al.*, 2006). Porém, como explicar um salto evolutivo tão vertiginoso que levasse uma enzima glicosil-hidrolítica da família 18 (quitinase) a desempenhar a função de um inibidor de uma enzima glicosil-hidrolítica de outra família (xilanases: GH10, 11)? Payan e colaboradores, ao propor o mecanismo de inibição das XIP sobre as xilanases, lançam luz sobre a evolução das XIP dentro da GH18. Segundo Payan, o mecanismo de inibição é baseado na mimetização do substrato e no bloqueio do sítio ativo, promovendo uma inibição reversível competitiva. Para tanto o fator preponderante encontra-se na topologia $(\beta/\alpha)_8$ das GH18, cujos “*loopings*” entre as folhas- β e as hélices- α interagem e bloqueiam o sítio ativo das xilanases (Figura 11) (Payan *et*



Payan, F. (2003), *Biochemical Journal*.

Figura 10: Estrutura secundária e terciária de XIP-I. (A) Diagrama de XIP-I com os componentes das estruturas secundárias numerados. Pontes disulfeto são mostradas em verde (B). Rotação da molécula em 90° ao longo do eixo vertical relative a orientação mostrada em (A).



Payan, F. (2004), *The Journal of Biological Chemistry*

Figure 11: Modelo do complexo ternário entre XIP-I e duas xilanases das famílias GH10 e 11. Regiões da molécula inibidora envolvidas no mecanismo de inibição são representadas por tubos vermelhos.

al., 2004). Assim sendo, a seleção positiva atuaria na conservação da expressão de genes parálogos a genes de quitinases de classe III que houvessem sofrido mutações sutis no sítio ativo, mesmo que estas mutações eliminassem a função catalítica, contanto que a topologia $(\beta/\alpha)_8$ fosse mantida, pois as proteínas codificadas por estes genes continuariam atuando na “batalha molecular” do apoplasto, só que dessa vez não mais como quitinases (na rota C da figura 9), e sim como inibidores de xilanases (na rota B da figura 9).



I.III. ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA O CONTROLE DE PRAGAS NOS CAMPOS DE ALGODÃO

I.III.I. O algodão: aspectos botânicos, produção e agronegócio no Brasil e no mundo

A atual classificação filogenética do algodão, segundo o “Angiosperm Phylogeny Group” (APG), dá-se segundo descrito no esquema abaixo:

Domínio: Eukarya

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Malvales

Família: Malvaceae

Gênero: *Gossypium*

Espécie: *Gossypium hirsutum*

onde a divisão Magnoliophyta compreende todas as plantas que produzem flores durante o seu ciclo reprodutivo; e a classe Magnoliopsida compreende as Magnoliophytas cujas sementes apresentam dois cotilédones. A ordem Malvales se distingue das demais Magnoliopsidas por características como folhas palmadas, sépalas em forma de cone e um córtex fibroso, constituído de finas camadas de floema. Na família Malvacea, as folhas são geralmente alternadas e há presença de estípulas. O caule apresenta canais e cavidades mucosas, e “pilus” também são encontrados. As flores podem ser unisexuadas ou bissexuadas, geralmente

actinomorfas e associadas a brácteas conspícuas, formando um epicálice. Os pistilos são compostos por dois ou mais carpelos conados. O ovário é superior com placentação axial.

Existem 4 espécies de algodão com importância econômica, a primeira (*G. hirsutum*), é natural da América Central e atualmente vem sendo cultivada de forma extensiva em vários países, dentre eles, os Estados Unidos, onde responde por mais de 95% dos campos de algodão. A segunda (*G. barbadense*) é originário da América do Sul e bastante cultivado no Peru, onde, acredita-se, tenha se originado. Essa espécie é mais conhecida pelo alto teor de Gossypol, um composto tóxico com atividade inseticida. Em terceiro e quarto lugar respectivamente encontram-se o *G. herbaceum* e o *G. arboreum*, sendo o primeiro natural do norte da África, mais precisamente nas zonas Saarianas; e o segundo natural das regiões entre a Índia e o Paquistão (Sauer, 1993).

No Brasil a espécie *G. hirsutum* (Figura 12) é a mais cultivada, sendo este um importante cultivar para o agronegócio brasileiro. A agricultura do algodão no Brasil ocupa atualmente uma área de 843 mil de hectares com produção estimada em 1,8 milhões de toneladas em caroço e 1,2 milhões de toneladas em pluma, conforme o quarto levantamento de grãos da Companhia Nacional de Abastecimento 2008/2009. Em 2009 esta cultura gerou um saldo líquido de 432 milhões de Dólares para o Brasil, que ocupa o quarto lugar entre os maiores exportadores de algodão no mundo, segundo estatísticas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Conab, 2009). Os três maiores produtores mundiais são: China (32,5 milhões de sacas), Índia (24,3 milhões de sacas) e os E.U.A (13 milhões de sacas).

I.III.II. Principais pragas nos campos de algodão do Brasil

Como todas as culturas o algodão está sujeito ao ataque de pragas. No Brasil, dentre as 6 pragas mais comuns nos campos de algodão encontram-se: i) o pulgão (*Aphis gossypii*), uma das primeiras pragas a atacar o algodoeiro, que suga a seiva da planta causando deformações e paralisação do crescimento; ii) as tripes (*Frankliniella schultzei*), favorecidas por condições de baixa umidade, geram áreas descoradas nas folhas podendo levar a paralisia do crescimento da planta; iii) o curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), uma mariposa vermelha que deposita seus ovos na face abaxial das folhas. As larvas, quando eclodem se alimentam de todo o tecido foliar ao longo das nervuras principais; iv) a lagarta-das-maçãs (*Heliothis virescens*), uma mariposa que deposita seus ovos de forma isolada nos ponteiros das plantas. As lagartas, quando eclodem, se alimentam de tecidos novos, folhas ou botões florais; v) a lagarta-militar (*Spodoptera frugiperda*), uma mariposa que deposita seus ovos sob as folhas e as brácteas dos

botões florais. Quando eclodem as lagartas raspam a superfície abaxial das folhas deixando-as necrosadas e em seguida infestam as plantas ao redor soltando-se ao vento pelo fio de seda; e vi) o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera) (Figura 13), que apresenta o maior potencial de dano, pois se abate sobre a planta durante diversas fases do seu desenvolvimento (Tabela 3), atacando e danificando o botão floral (PAPA, 2006).

I.III.III. Controle de pragas nos campos de algodão do Brasil

Os cultivares de algodão convivem com uma grande diversidade de insetos-praga que atacam diferentes partes da planta, como raízes, folhas, flores, botões florais e frutos. O controle dessas pragas, na grande maioria dos casos, é feito por métodos convencionais, isto é, por monitoramento e uso de inseticidas químicos como Alfa-cipermetrina, Beta-ciflutrina e Carbaryl, que além de tóxicos para células de vertebrados, permanecem por muito tempo no ambiente podendo contaminar cursos d'água e assim gerar maiores problemas ambientais. Alternativas menos danosas, como o controle biológico e utilização de feromônios são abordagens que, em menor escala, também são utilizadas por produtores brasileiros (PAPA, 2006). Variedades transgênicas resistentes a determinadas pragas já são uma realidade nos campos brasileiros e estão disponíveis para o produtor desde a safra de 2006 (Diário Oficial da União, 2005). Nos EUA essa abordagem gerou uma diminuição no uso de pesticidas entre 1996 e 2006 da ordem de 289.000 toneladas métricas, equivalente a uma redução de 15,5% (James, 2008). Na China, onde a aplicação de pesticidas é feita manualmente, a intoxicação de técnicos agrícolas por agroquímicos caiu em 75% (Grossi de Sá & Giband, 2006). Com a liberação do cultivo de algodões transgênicos em 2005, nos últimos 5 anos o Brasil passou a se beneficiar de tais vantagens.

I.III.IV. Estratégias moleculares para o controle de pragas que afetam o algodão

Desde que a primeira planta transgênica tornou-se comercialmente disponível, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante para a obtenção de organismos geneticamente modificados vem contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de proteção agrícola. Durante o período de 2006 à 2007 o caráter preferencialmente desenvolvido dentre os cultivares transgênicos foi a tolerância a herbicidas e a insetos. Desde então, variedades transformadas com um único gene que conferia tais características deram lugar a variedades que



(A)

(B)

*Fonte: (A) Forest & Kim Starr (starrimages@hear.org);
(B) khfirdavs.files.wordpress.com/2009/09/cotton

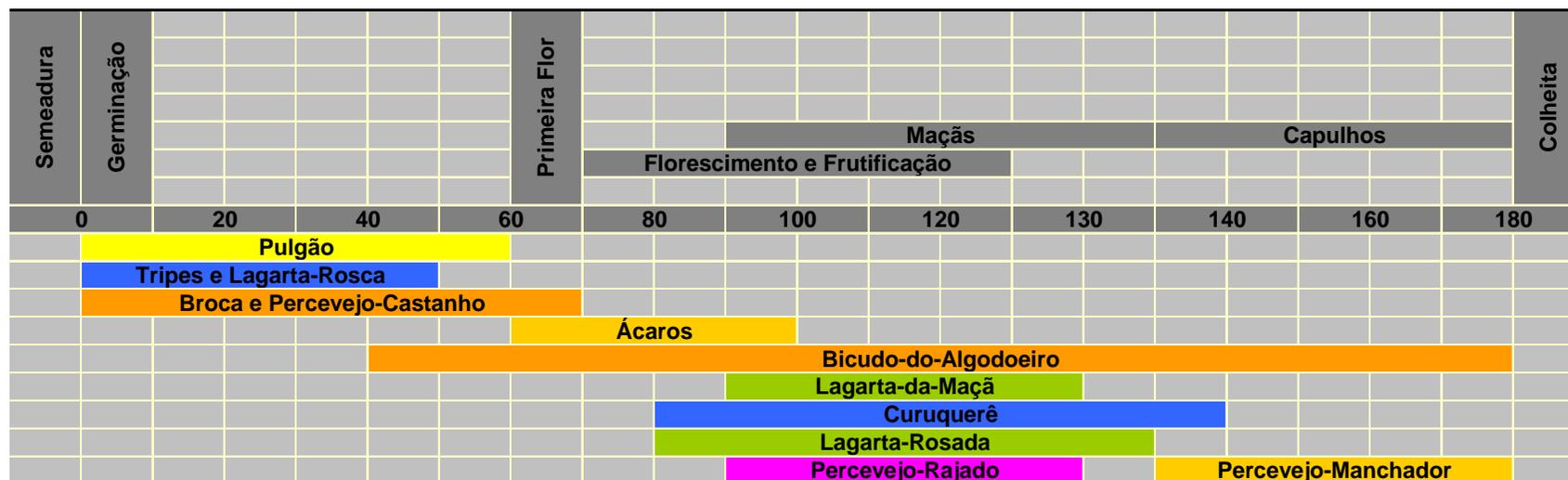
Figura 12: O Algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). (A) Detalhe de uma maçã e de um capulho do algodoeiro. (B) Campo de algodoeiros pronto para a colheita.



*Fonte: <http://www.senasa.gov.ar>

Figura 13: Bicudo-do-algodoeiro (*Anthrenus grandis*). Detalhe do inseto sobre o botão floral do algodoeiro.

Tabela 3: Esquema geral da ocorrência de pragas na cultura do algodoeiro.



*Fonte: Belot (2006); adaptado de Gallo, 2002.

carregam mais de um desses genes (*Stacked traits*), um exemplo é o algodão Roundup Ready®/INGARD®, da companhia Monsanto, que apresenta tolerância a insetos e resistência a herbicida simultaneamente.

As buscas na natureza por novos genes que possam ser utilizados em programas biotecnológicos, em especial visando o melhoramento do algodão, é constante, bem como o desenvolvimento de novas estratégias moleculares para a obtenção de plantas transgênicas mais produtivas, como será mostrado a seguir.

I.III.IV.I. Moléculas candidatas

Toxinas Cry. Toxinas Cry têm sido extensivamente exploradas no controle biológico de insetos-praga (Frankenhuyzen, 2009), trazendo grandes vantagens sobre o uso de agentes agroquímicos, como a alta especificidade e toxicidade contra os insetos alvo, sendo menos danosas para as plantas, vertebrados e demais invertebrados, incluindo insetos não-alvo (Schnepf *et al.*, 1998). Algumas toxinas Cry foram utilizadas para gerar variedades transgênicas de algodão resistentes a insetos, como o Bollgard I (CryAc), resistente a *Alabama argillacea*, *Pectinophora gossypiella* e *Heliothis virescens*; o Bollgard II (Cry1Ac + Cry2Ab), resistente a *Helicoverpa caterpillars*; e o WideStrike (Cry1Fa2 + Cry1Ac), resistente a *Hlicoverpa. zea*, *H. virescens*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Pseudoplusia includens*, *Trichoplusia ni* e *P. gossypiella*. Como percebe-se, nenhuma dessas variedades disponíveis apresenta resistência ao bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*), nem mesmo a nenhum outro inseto da ordem coleóptera, o que justifica as pesquisas que vem sendo realizadas no Brasil em busca de toxinas Cry com atividade contra coleópteros (Grossi-de-Sa *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2007).

Proteínas Vegetativas Inseticidas (Vegetative Insecticidal Proteins) – VIPs. Como as toxinas Cry, as VIPs apresentam um restrito e diferenciado espectro de atividade. Alguns insetos não susceptíveis a toxinas Cry sucumbem a algumas VIPs (Bhalla *et al.*, 2005), o que faz dessas moléculas boas candidatas para serem utilizadas junto às toxinas Cry em programas de melhoramento do algodão. Atualmente duas variedades de algodão transgênicos da Syngenta, resistentes a lepidópteros, estão sendo avaliadas para comercialização, uma delas carregando unicamente o gene *vip3A*, e uma outra os genes *vip3A* e *cry1Ab*, que conferem resistência a *H. virescens* e *S. frugiperda* (Adamczyk & Mahaffey, 2008).

I.III.IV.II. Técnicas e aplicações

Genes piramidados (Stacked genes). Por esta abordagem dois ou mais genes,

preferencialmente codificando proteínas com diferentes mecanismos de ação, podem ser incorporados em um vetor e inseridos em plantas para reforçar o caráter desejado ou atrasar o surgimento de resistência entre as pragas (Maruthasalam *et al.*, 2007). Algodão transgênico expressando o gene *cry1Ac* junto a um gene que codifica para CpTI (Cowpea Trypsin Inhibitor) resultou em maiores níveis de resistência a *Helicoverpa zea* (Shirong, 2004), já a variedade Bollgard II foi construída pela piramidização de dois genes de *B. thuringiensis* (*cry1Ac* e *cry2Ab*), e foi aprovado para o controle de lepidópteros. Algodão transgênico resistente a insetos e tolerante a herbicida também foi desenvolvido por essa técnica e já é um produto de mercado (Halpin, 2005). Mais recentemente as empresas Monsanto e Dow Agrosience lançaram um milho com 8 genes piramidados, sendo 6 de resistência a insetos (*cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry3Bb1* modificado, *cry1F*, *cry1A.105* e *cry2Ab*) e dois genes de tolerância aos herbicidas glifosato e glifosinato de amônio (Gatehouse, 2008).

Proteínas de fusão. Uma outra abordagem para elevar a toxicidade de um organismo transgênico por meio da inserção de múltiplos aspectos é fundir diferentes genes criando proteínas de fusão, as quais se encontrarão covalentemente associadas. Fitches e colaboradores reportaram a construção de uma proteína de fusão composta por uma lectina (GNA), fundida a uma neurotoxina de veneno de aranha (*Segestria florentina* toxin: SFI1). Essa molécula recombinante mostrou-se capaz de ser transportada para a hemolinfa de *Lacanobia oleracea* causando 100% de mortalidade depois de 6 dias (Fitches *et al.*, 2004a). Mais tarde o mesmo grupo descreveu a fusão de uma toxina de escorpião (ButalT) com a mesma GNA gerando uma proteína de fusão ativa contra *Lacanobia oleracea* (Trung *et al.*, 2006).

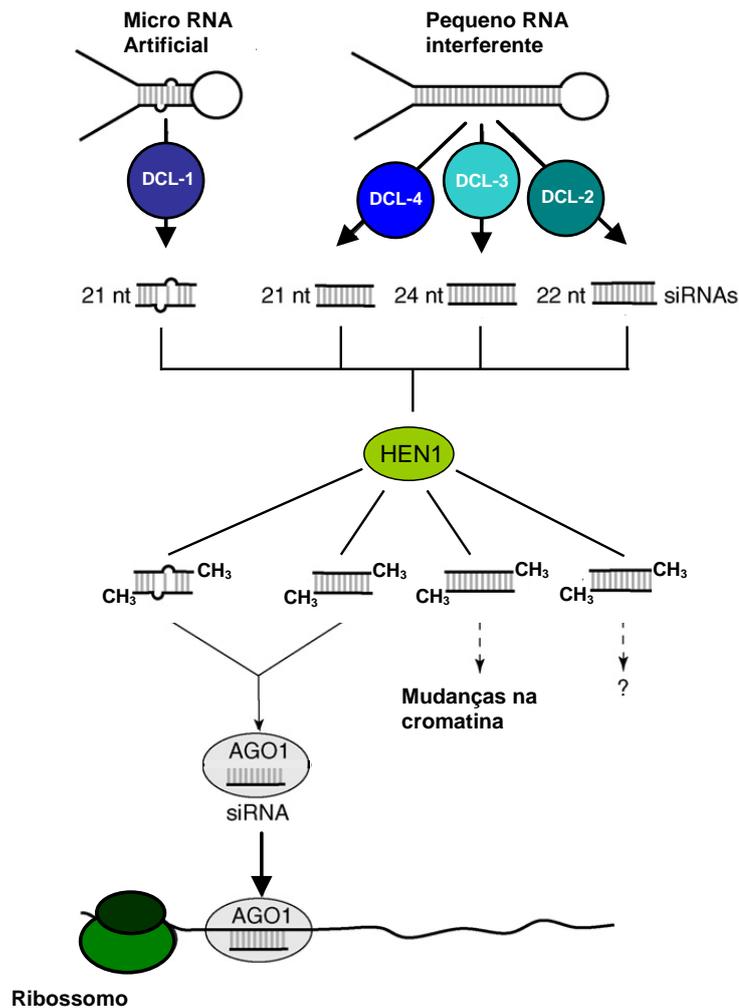
Evolução molecular “in vitro”. Além da mutagênese sítio-dirigida, que consiste na mudança pontual de algum resíduo de uma macromolécula a fim de se estudar aspectos estruturais da atividade, a evolução molecular *in vitro* com seleção de variantes é uma poderosa e versátil nova tecnologia que serve ao mesmo propósito. Esta metodologia tem sido utilizada para aumentar a atividade de algumas moléculas contra insetos-praga através de *DNA Shuffling*, como descrito por Stemmer (1994) e Zhao & Arnold (1997). Essa técnica de evolução *in vitro* consiste em um conjunto de ácidos nucléicos homólogos que são fragmentados e submetidos a sucessivos ciclos amplificação sem a utilização de *primers* propriamente ditos, onde os homo e heteroduplex gerados pelo pareamento dos fragmentos homólogos funcionam como *primers* gerando bibliotecas de seqüências aleatórias que podem ser avaliadas em busca de mutantes promissores. Diferentes genes podem ser combinados usando-se essa metodologia gerando proteínas quiméricas, as quais são selecionadas utilizando-se um sistema altamente eficiente de expressão de proteínas, como o *Phage Display* (Barbas *et al.*, 2001). Como um exemplo o grupo

do Laboratório Planta-Praga I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utilizou *DNA Shuffling* e *Phage Display* para gerar e selecionar variantes do gene *cry8Ka1* numa biblioteca combinatorial. Quando comparados ao gene parental, alguns mutantes mostraram maior toxicidade ao *A. grandis* (Grossi-de-Sá *et al.*, patente em preparação, 2008). Da mesma forma, a busca por variantes de um inibidor de α -amilase em uma biblioteca combinatorial construída a partir de genes de inibidores de α -amilase α -AI-1 e α -AI-2, isolados de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) produziu variantes ativas contra enzimas digestivas de *A. grandis* (Grossi-de-Sá, 2005).

RNA interferente. Recentemente a descoberta de vias de regulação da expressão gênica e de defesa celular baseadas em RNAs não codificantes chamaram a atenção da comunidade científica para essas velhas conhecidas moléculas, os RNAs, como se um “*novo velho mundo de RNA*” estivesse sendo descoberto.

RNA interferente, ou silenciamento por RNA, refere-se coletivamente a diversos processos mediados por moléculas de RNA que ocorrem na maior parte das células eucarióticas e resultam na inibição seqüência-específica de um gene. Tal inibição pode se dar no nível transcricional, traducional ou simplesmente afetando a estabilidade do mRNA. Esses processos compartilham três passos bioquímicos básicos: i) formação de RNA fita-dupla (*double strand - ds*)RNA; ii) processamento de dsRNA a pequenos (*small - s*) 20-24 nucleotídeos dsRNA; e iii) ação inibitória das fitas de sRNAs selecionadas no complexo efetor agindo sobre um RNA ou DNA complementar (Figura 14). Essa maquinaria pode funcionar como um mecanismo regulador sobre RNAs endógenos ou, no caso de RNAs exógenos, como uma resposta imune baseada em RNA.

No tocante a biotecnologia do algodão essa técnica é bastante útil para gerar plantas transgênicas resistentes a insetos ou com modificações químicas para melhorar a qualidade da fibra. Um milho resistente a coleópteros foi desenvolvido pela expressão de (ds)RNA de *Diabrotica virgifera*, onde a ingestão do (ds)RNA pelo coleóptero desencadeou a Via de RNAi, confirmando o seu potencial para o controle de insetos praga (Baum *et al.*, 2007). Contudo, devido ao curto comprimento do siRNA, a interação com RNA endógenos não-alvo e silenciamento de genes não-alvo é imprevisível, o que acarreta num importante risco dessa abordagem, como revisto por Echeverri e colaboradores (Echeverri *et al.*, 2006).



Modificado de Small, I. (2007), *Current Opinion in Biotechnology*; e Kanazawa, A. (2008), *Plant Biotechnology*

Figura 14: Vias de RNAi em plantas. RNAi pode ser induzido em plantas pela expressão de micro RNAs artificiais (amiRNA) ou pela introdução de um pequeno RNA interferente sintético (siRNA), dentre outros modos. amiRNAs são processados pela enzima Dicer-like 1 (DCL1), enquanto siRNAs são predominantemente processados pela DCL4, produzindo siRNAs de 21 nucleotídeos, os quais são metilados pela HUA ENHANCER1 (HEN1), uma metil transferase específica de plantas. O siRNA metilado é acoplado a um complexo de silenciamento onde a proteína AGO1 é o maior componente. O complexo AGO1–siRNA inibe a expressão dos mRNAs que carregam as seqüências complementares pela clivagem do RNA alvo ou prevenindo sua tradução. Alguns dos efeitos do RNAi podem resultar da produção de siRNAs por meio das vias DCL2 e DCL3; por exemplo, o siRNA de 24 nucleotídeos produzido pela DCL3 causa modificações na cromatina que podem levar ao silenciamento transcricional do gene alvo (Modified from Small, 2007 and Kanazawa, 2008).

I.IV. ALVOS MOLECULARES PARA O CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

I.IV.I. Atividade xilanásica na interação planta-fungos

Fungos secretam uma gama de enzimas como proteases, lípases, α -amilases, celulasas e xilanases no intuito de transformar a matéria orgânica ambiental em fonte de carbono ou obter espaço para a infecção da célula a ser invadida. Em alguns casos xilanases compreendem 75% de todas as proteínas secretadas por esses microrganismos (Khandke *et al.*, 1989), sendo a síntese e secreção destas enzimas induzidas por xilana ou compostos contendo xilana, como polpa da beterraba, bagaço de cana de açúcar, papel, dentre outros (Maheshwari *et al.*, 2000).

Uma multiplicidade de isoformas de xilanases é conhecida em fungos mesofílicos e termofílicos. Essas isoformas diferem entre si no que diz respeito à estabilidade, eficiência catalítica, atividade sobre o substrato e massa molecular. Tamanha variabilidade bioquímica levou alguns autores a desacreditar a importância de tais enzimas na virulência dos patógenos, pois experimentos de deleção de genes de xilanases não mostravam alteração na capacidade infectiva de fungos (Juge, 2006). Mais tarde essa observação foi justificada pela multiplicidade de genes que codificam proteínas funcionalmente redundantes. Hatsch e colegas mostraram que quando *Fusarium* cresce em um meio rico em xilana, mais de 30 genes relacionados à xilanases são transcritos (Hatsch *et al.*, 2006). Apesar disso, a importância dessas moléculas para a infectividade de fungos se tornou patente quando a deleção de um gene codificador de uma endoxilanase de *B. cinera* levou a uma queda significativa na virulência do fungo, retardando o surgimento de lesões secundárias em folhas de tomate (Brito *et al.*, 2006). A grande diversidade dessa família de enzimas hidrolíticas pode ser explicada pela necessidade de difusão dessas moléculas nas diferentes estruturas das paredes celulares dos mais variados órgãos (folhas, troncos, raízes) e espécies vegetais (Prabhu & Maheshwari, 1999).

Até o momento nenhuma outra atividade para essa classe de enzima foi descrita além da degradação de compostos contendo xilana para a utilização, por parte do fungo (ou bactéria) desse açúcar como fonte de carbono ou para invasão das células hospedeiras. Xilanases parecem não desempenhar nenhuma função reguladora nos organismos que as produzem, porém organismos infectados por patógenos secretores de xilanases desenvolveram um sistema de defesa no qual tais enzimas atuam como elicitores de resposta de defesa como resultado de uma interação “ligante-receptor” (Ron & Avni, 2004).

I.IV.II. Xilanases como alvo para o controle de fungos fitopatogênicos

Sendo os polímeros de xilana os segundos mais abundantes na parede celular vegetal, compondo 40% da parede celular primária de monocotiledôneas e atrás apenas da celulose, a degradação desses polímeros pelas xilanases dos patógenos é um passo crucial para a infecção da célula vegetal, o que faz da inibição dessas xilanases, por parte da célula hospedeira, uma estratégia de defesa fundamental no modelo em “zig-zag” da interação planta-patógeno.

Xilanases são enzimas pertencentes às famílias 8, 10 e 11 das Glicosil-hidrolases (GH8, 10 e 11) capazes de clivar ligações xilosídicas do tipo $\beta(1-4)$ ou $\beta(1-3)$ entre os resíduos de xilopiranosose que compõem a xilana (Collins *et al.*, 2002; 2005). Diversas xilanases de fungos, bactérias e nematóides fitopatogênicos já foram isoladas e caracterizadas (Lo *et al.*, 2009; Khan & Sims, 2005; Dautova *et al.*, 2006). Alguns inibidores de enzimas que degradam a parede celular vegetal, já foram descritos no tópico I.I.IV. As XIPs, as TAXI e as TL-XI são capazes de inibir xilanases de patógenos sem afetar a atividade dessas enzimas hidrolíticas endógenas dos vegetais. Tal tarefa mostra-se extremamente difícil de ser cumprida, devido à grande quantidade de genes codificadores de xilanases e a diversidade de isoformas dessas enzimas encontrados em um único microrganismo fitopatogênico (Prabhu & Maheshwari, 1999; Hatsch *et al.*, 2006). Um inibidor capaz de suprimir significativamente a atividade xilanásica dos patógenos deverá apresentar atividade sobre diversas formas de xilanases. Neste ponto as TAXIs e as TL-XI encontram-se em desvantagem em relação às XIP, pois as primeiras são capazes de inibir apenas xilanases da família GH11, enquanto as XIP inibem tanto xilanases da família GH11 quanto as da GH10 (Juge, 2006). Outros resultados também põem as XIPs a frente de TAXIs e TL-XI, como os apresentados por Igawa e colaboradores que sugeriram papéis diferentes para XIPs e TAXIs na defesa vegetal, visto que a expressão de genes codificadores de XIPs é induzida por fatores que desencadeiam respostas de defesa por parte das plantas, enquanto os genes para TAXIs analisados, não (Igawa *et al.*, 2005). XIPs também se mostraram inibidores mais potentes que as TAXIs sobre uma xilanase de *Penicillium* (Furniss *et al.*, 2002). Para nenhum dos três tipos de inibidores, até o momento, foi relatada atividade inibitória para as xilanases da família GH8.

Apesar do importante papel das enzimas xilanásicas no processo de infecção das plantas, essas moléculas ainda são subestimadas como alvo para programas biotecnológicos que visem a geração de resistência em plantas suscetíveis a patógenos como fungos, bactérias e nematóides.

I.V. O PROJETO GENOMA CAFÉ

I.V.I. Histórico

Devido a importância econômica do café, produzido em mais de 60 países e que movimentava um mercado de 10 à 12 milhões de dólares por ano, o seqüenciamento do seu genoma pela comunidade científica constituía um marco bastante esperado pelos setores de produção, indústria e comércio mundial dessa cultura. Sendo o Brasil um dos três maiores produtores mundiais – Brasil (46 milhões de sacas), Vietnam (16 milhões) e Colômbia (10,5 milhões) respondem por mais de 50% da produção mundial, sendo o Brasil sozinho responsável por mais de um terço da produção (International Coffee Organization, 2008) - foi dos pesquisadores brasileiros a iniciativa de seqüenciar o genoma do café a partir de bibliotecas de cDNA de três espécies: *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea racemosa*; cujos germoplasmas foram disponibilizados por centros de pesquisas brasileiros (Vieira *et al.*, 2006).

O Projeto Genoma Café Brasileiro foi formulado em 2002 através de um acordo de cooperação assinado entre o Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), um consórcio nacional de 40 universidades e institutos de pesquisa, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Fórum Permanente das Relações Universidade-Empresa (UNIEMP), sendo o CBP&D o responsável pela coordenação central do projeto. Em um passo inicial o projeto compôs um banco de dados com mais de 200.000 “reads”, contendo 25.000 genes, o que representa em torno de 2/3 de todos os genes do café. O acesso ao banco de dados é livre para 6 universidades públicas ligadas à FAPESP e para organizações e institutos de pesquisa membros do CBP&D, contudo qualquer outro usuário pode utilizar o banco de dados com acesso limitado após aprovação por parte do comitê de diretrizes do Projeto Genoma Café, conquanto que um contrato de condições específicas seja lavrado para a proteção dos direitos de propriedade intelectual do projeto (Vieira *et al.*, 2006).

O Projeto Genoma Café Brasileiro foi desenvolvido com o intuito de disponibilizar à comunidade científica recursos da genômica moderna que permitissem o desenvolvimento de programas biotecnológicos voltados para o incremento do agronegócio do café. Para isso, foram seqüenciados 214.964 clones escolhidos aleatoriamente de 37 bibliotecas de cDNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* representando estádios específicos do desenvolvimento de células e de tecidos do cafeeiro, bem como tecidos e órgãos submetidos a estresses bióticos e abióticos, resultando em 130.792, 12.381 e 10.566 seqüências de cada espécie. Os ESTs foram agrupados em 17.982 *contigs* e em 32.155 *singletons*. A comparação destas seqüências pelo

programa BLAST revelou que 22% não tiveram nenhuma similaridade significativa às seqüências no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (de função conhecida ou desconhecida). A base de dados de ESTs do cafeeiro resultou na identificação de cerca de 33.000 unigenes diferentes. Os resultados de anotação das seqüências foram armazenados em base de dados “online” em <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>, estando à disposição de pesquisadores do Brasil e do exterior que atuam em projetos que visam o melhoramento da cultura do café e a competitividade desta cultura no mercado (Vieira *et al.*, 2006).

I.IV.II. O Genoma Café como fonte de genes para uso biotecnológico

Assim como o café, diversas outras importantes culturas mundiais tiveram seus genomas seqüenciados recentemente, como por exemplo, a cana-de-açúcar (Sugar Cane EST Genome Project – SUCEST) e o arroz (Rice Genome Annotation Project). A disponibilização de genomas em bancos de dados de ESTs constitui-se em uma ferramenta poderosa disponibilizada ao pesquisador.

Até o início da “Era Genômica”, o pesquisador contava apenas com uma abordagem direta frente à natureza para encontrar a atividade biológica desejada, isolar a molécula ativa e estudá-la estruturalmente ou em ação sobre sistemas biológicos. Com a disponibilização de bancos de dados de genomas os pesquisadores têm a opção de iniciar um trabalho *in silico*, analisando e comparando seqüências de genes de um único organismo ou de organismos diferentes. O Projeto Genoma Café, além de um importante documento de caracterização molecular do café, lança luz sobre os processos de regulação da expressão gênica e sobre genes envolvidos em respostas a estresses bióticos e abióticos. As 37 bibliotecas de ESTs utilizadas foram construídas a partir dos mais diversos tipos celulares e células cultivadas *in vitro* submetidos a diferentes condições ambientais e infecções por patógenos, como bactérias e nematóides (Vieira *et al.*, 2006). As bibliotecas de ESTs evidenciam genes induzidos em resposta a reguladores de crescimento vegetal, como ácido aracdônico; a estresses salino; a infecção por nematóides e *Xyllela spp.*; dentre outras situações. A expressão gênica também foi documentada no tocante a variação espacial em diferentes órgãos como raízes, folhas e calos embriogênicos (Vieira *et al.*, 2006).

Os dados levantados pelo projeto já geraram frutos no que diz respeito à compreensão de aspectos genéticos e moleculares dessa cultura. Em 2008 Priolli e colaboradores conseguiram estudar o padrão de herança de genes relacionados à síntese de cafeína entre híbridos de *C.*

arabica e *C. canephora* (Priolli *et al.*, 2008). Em 2009 Maluf e colegas esclareceram questões sobre os mecanismos moleculares da síntese de cafeína em frutos com alto ou baixo teor dessa substância (Maluf *et al.*, 2009). Estudos sobre genes do café relacionados à resistência a pragas são atualmente conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial no Laboratório Planta-Praga I. Sendo um deles relacionado a um inibidor de xilanase do tipo quitinase (reportado nesta tese) e um segundo relacionado a uma defensina com atividade antifúngica.

A disponibilidade de tamanha quantidade de informação sobre a dinâmica molecular do café é sim uma ferramenta importante, porém a utilização de tais bancos de dados deve ser utilizada com cautela quando se busca a função de determinado gene. A existência de genes parálogos (ver item I.II.I) pode levar a incorreta relação entre a seqüência de um gene e sua função, sendo um dos objetivos dessa obra tornar patente a importância dos critérios utilizados nos processos de anotação de genomas bem como os riscos da predição da função gênica baseada em seqüências depositadas em bancos de dados.



I.VI. A SOJA (*Glycine max*)

I.VI.I. Aspectos botânicos, origem e histórico agrícola

A soja é uma leguminosa, e como tal é classificada filogeneticamente como pertencente à Divisão Magnoliophyta; Classe Magnoliopsida; Ordem Fabales; Família Fabaceae e Gênero *Glycine*, de acordo com a atual classificação de angiospermas. O gênero *Glycine* é subdividido em dois subgêneros, *Glycine* e *Soja*. O Subgênero *Soja* (Moench) F.J. Herm. inclui a soja domesticada, *Glycine max* (L.) Merr. e o tipo selvagem *Glycine soja* Sieb. & Zucc. (Singh & Jauahr, 2005). Ambas são espécies anuais cujo crescimento lhes permite atingir alturas que variam de 20 cm à 2 metros. Os caules, as folhas e as vagens são cobertos por finos pilos. As folhas são trifolheadas e os folíolos possuem de 6 à 15 cm de comprimento e 2 à 7 de largura, que caem após a maturação das sementes. As flores, de cores branca, rosa ou púrpura, sofrem

autopolinização e apresentam placentação axial. Os frutos são vagens capilares que crescem em pedúnculos de 3 à 5 vagens medindo de 3 à 8 cm. Cada vagem contém de 2 à 4 sementes com diâmetro aproximado de 5 à 11 mm (Figura 15) (Newell & Hymowitz, 1983). As condições ótimas de crescimento incluem temperaturas entre 20 e 30 °C e solos aluviais com bom conteúdo orgânico. Os cultivares modernos tem uma média de altura de 1 m e seu ciclo de vida leva em torno de 80 à 120 dias (Wik, 1962).

A espécie mais cultivada atualmente é a *Glycine Max* (L.) Merr, que se originou da domesticação da soja selvagem *Glycine soja* Seib. et Zucc., o que aconteceu há aproximadamente 5.000 anos ao sul da China (Gai, 1997). A soja domesticada apareceu na literatura pela primeira vez em 1753 na obra “Species Plantarum”, de Carl Linnaeus. Inicialmente foi denominada *Phaseolus max* L., e mais tarde, em 1917, Elmer Drew Merrill, um botânico americano, propôs o nome válido atualmente (Singh & Jauahr, 2005).

A dispersão da soja domesticada na China não aconteceu rapidamente, por exemplo, os registros da cultura da soja no Japão não datam de mais de 2.000 anos (Li & Nelson, 2001). Em 1700 a soja foi introduzida na Europa sendo, em 1765, levada a América do Norte visando o mercado de molho de soja. Cinco anos depois ela passou a ser utilizada também como forragem (Wei *et al.*, 1983) e somente no início do século XX, mais precisamente em 1915, a soja passou a ser utilizada com a finalidade que hoje é o principal objetivo do seu cultivo mundial, a produção de óleo de soja (Wilson, 1987). A descoberta da soja como uma importante fonte de óleo vegetal mudou permanentemente a percepção da sua produção. Essa transição trouxe a necessidade de novos cultivares mais produtivos. Na década de 1930 o Departamento de Agricultura Americano (USDA) iniciou programas de melhoramento, o que foi reforçado pela aquisição de mais de 4.000 variedades de soja chinesas. Atualmente o banco de germoplasma de soja do USDA contém mais de 18.000 cultivares de *Glycine max* (USDA, ARS 2007).

A soja adentrou o Brasil em 1882, quando o Professor Gustavo Dutra, da Escola de Agronomia da Bahia, realizou estudos de avaliação de cultivares vindas dos EUA. Em 1900 o Instituto Agrônomo de Campinas, SP, promoveu a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas, e nessa mesma data registrou-se o primeiro cultivo de soja no Rio Grande do Sul, onde a cultura encontrou ótimas condições para se expandir, dada a adaptabilidade do material genético existente no Brasil com as condições climáticas predominantes no extremo sul do país (Bonato & Bonato, 1987). A exemplo dos EUA, no Brasil também a soja começou a ser cultivada como planta forrageira e só em 1941, com a implantação da primeira indústria processadora de soja no país (Santa Rosa, RS), a cultura da soja passou a



(A)

(B)

(C)

*Fonte: (A) <http://www.dpi.qld.gov.au>; (B) <http://katynally.files.wordpress.com>;
(C) <http://blog.wanderingspoon.com>

Figura 15: A soja. (A) Cultivo de soja *Glycine max* L. (B) Pedúnculo contendo duas vagens de soja. (C) Sementes de soja.

ter na produção de grãos a sua prioridade. Naquele mesmo ano, com uma produção de 25.000 t, o Brasil apareceu pela primeira vez como produtor de soja nas estatísticas internacionais (Bonato & Bonato, 1987). Entre 1940 e 1960 a cultura da soja se beneficiou dos incentivos agrícolas destinados a triticultura, naquela época a soja era plantada em rotação de cultura com o trigo, pois era a melhor alternativa de verão para suceder o trigo plantado no inverno. Apenas na década de 1960 a soja realmente se estabeleceu como uma cultura economicamente importante para o Brasil, e no decorrer de nove anos sua produção quintuplicou, de 206 mil toneladas em 1960, para 1,056 milhão de toneladas em 1969 (Bonato & Bonato, 1987).

Atualmente a região Centro-Oeste do Brasil é a maior produtora de soja, seguida de perto pela região Sul. A região sudeste também é um importante pólo de produção, como o próximo item deixará evidente ao expor os dados do agronegócio da soja no Brasil nos últimos anos.

I.VI.II. Produção e agronegócio no Brasil e no mundo

Atualmente os seis maiores produtores de soja no mundo são: Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai (na ordem em que são citados). A produção de cada um deles nos últimos 10 anos, segundo os dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa), encontra-se descrita na tabela 4. Nos Estados Unidos, o maior produtor mundial, a produção de soja movimentou um mercado de 27 bilhões de Dólares em 2008. No ano em questão a área plantada foi de 30,3 milhões de hectares e os campos apresentaram uma produtividade média de 2.500 kg/ha, segundo os dados do United States Agriculture Department Service – USDA (<http://www.nass.usda.gov>).

Em 2006 o Brasil exportou 35,8 milhões de toneladas de soja, incluindo seus derivados, o que rendeu ao país 8,7 bilhões de dólares, o maior valor da balança comercial brasileira relativo a produtos agropecuários naquele ano. No ano seguinte as exportações brasileiras de soja cresceram em torno de 20%, e em 2008, devido a alta no preço internacional, o Brasil lucrou 17,2 bilhões de Dólares com a exportação de soja (um aumento de aproximadamente 70%), apesar de que o aumento em toneladas exportadas tenha sido de apenas 5,6%. A turbulenta situação financeira mundial que assolou o mundo entre setembro de 2008 e julho de 2009 (“*Credit Crunch*”) foi responsável por essa alta no preço. Enquanto a economia mundial se debatia para superar a crise, auxílios financeiros fizeram o preço da soja cair, e em 2009, com a exportação de 41,5 milhões de toneladas (9,8% a mais que em 2008) o Brasil lucra não mais que

Tabela 4: Principais países produtores de soja (em milhões de toneladas).

	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
Estados Unidos	74,6	72,22	75,06	78,67	75,01	66,78	85,01	83,37	86,77	72,86	80,54
Brasil	30,77	32,34	38,43	41,92	52,02	49,79	52,3	55,03	58,39	61	57
Argentina	20	21,2	27,2	30	35,5	33	39	40,5	48,8	46,2	43
China	15,15	14,29	15,4	15,41	16,51	15,39	17,4	16,35	15,97	14	16,8
Índia	6	5,2	5,25	5,4	4	6,8	5,85	6,3	7,69	9,3	10
Paraguai	3,05	2,9	3,4	3,55	4,5	3,91	4,05	4	6,2	6,8	4
Demais países	9,72	9,84	9,18	8,31	9,26	9,63	11,41	12,38	12,83	10,72	11,94
Mundo	159,29	157,99	173,92	183,26	196,8	185,3	215,02	217,93	236,65	220,88	223,28

Fonte: Anuário estatístico de agroenergia. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2009).

16,8 bilhões de Dólares (deficit de 2,3% nas exportações entre 2008 e 2009) (Conab, 2006; 2007; 2008; 2009). Esta queda está longe de ser um indicativo de que o mercado está entrando em uma zona de saturação, porém aponta uma necessidade de melhoramento das técnicas de produção para que a cultura da soja no Brasil mantenha-se competitiva no mercado internacional.

Dentre as cinco mais plantadas culturas do Brasil, a soja ocupa o primeiro lugar, com 21,7 milhões de hectares; seguida pelo milho (14,1 milhões ha), feijão (4,1 milhões ha), arroz (2,9 milhões ha) e trigo (2,4 milhões ha) (Conab, 2009). No Brasil a principal região produtora de soja é a Centro-Oeste com 9,9 milhões de hectares plantados, dos quais 5,8 milhões encontram-se no Mato-Grosso; contudo, esse estado, com uma produtividade de 3.000 kg/ha, perde nesse item para o Distrito Federal, que apresenta produtividade de 3.200 kg/ha em uma área plantada de 48,9 mil hectares. A segunda região com maior área plantada é a Sul, com 8,2 milhões de hectares dos quais 4 milhões encontram-se no Paraná; porém a região Sudeste, com Minas Gerais como o maior estado produtor possuindo 914 mil hectares de área plantada, apresenta uma produtividade de 2.700 kg/ha, contra 2.200 kg/ha na região Sul (Tabela 5) (dados da “Série histórica de área plantada - Safras 1976/77 a 2008/09 – Soja Brasil”. <http://www.conab.gov.br>). Tais divergências no tocante a área plantada e produtividade podem ser explicadas por diferenças edafoclimáticas entre as regiões, o que implica em uma desigual susceptibilidade a pragas e doenças; por fatores climáticos isolados, como a ausência de chuvas na região Sul durante os primeiros 4 meses de 2009; e por diferenças na utilização de tecnologias para a produção agrícola. Vale ressaltar, de acordo com os dados apresentados acima, o quanto os campos brasileiros, em especial os da região Centro-Oeste, são mais produtivos que os campos dos EUA.

Dentre os fatores citados acima, que tornam desigual a produtividade dos campos de soja nas diferentes regiões produtoras no Brasil, serão focados no próximo item os de ordem biótica relacionados as doenças e pragas que afetam os campos de soja do Brasil.

I.VI.III. Pragas, doenças e controle fitossanitário nos campos de soja do Brasil

Durante todo o seu ciclo a cultura da soja está sujeita ao ataque de diferentes tipos de insetos, fungos, bactérias, vírus e nematóides, que devem ser controlados de modo a não comprometerem a produtividade dos campos. É estimado que as perdas anuais nos campos de

Tabela 5: Área de plantio X produtividade nas principais regiões e estados produtores

	Centro-oeste			Sudeste		Sul	
	Mato Grosso	Distrito Federal	Outros estados	Minas Gerais	São Paulo	Paraná	Outros estados
Área plantada (em 1000 ha)	5.828,20	48,9	4.022,00	914,8	531,3	4.069,20	4.207
Produtividade (em kg/ha)	3.082	3.200	2.700*	2.941	2.459	2.337	2.321*

* Média da produtividade dos demais estados.

Fonte: Série histórica de área plantada - Safras 1976/77 a 2008/09 – Soja Brasil.
<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>.

soja devido a pragas e doenças seja da ordem de 15 à 20% (Mesquita *et al.*, 1998). Neste tópico serão apresentadas as mais importantes pragas e doenças causadas por fungos que atacam os campos de soja no Brasil, bem como os modos convencionais de controle dessas pragas e doenças. Uma completa revisão sobre a cultura da soja, incluído as principais pragas e doenças constatadas nos campos brasileiros, bem como as técnicas de manejo, está disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja> - Tecnologia de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004.

Insetos-praga

Os insetos praga que atacam os campos de soja no Brasil são categorizados como “principais”, “regionalmente importantes” e “secundários” em função da frequência, abrangência e danos provocados a cultura (Miyasaka & Medina, 1981). Naturalmente a população desses insetos é mantida sob controle por predadores naturais, sendo assim não se indica a aplicação preventiva de inseticidas químicos. Porém, quando a população de insetos-praga, por algum motivo, atinge níveis que comprometem a produtividade dos campos, medidas devem ser tomadas com base nos princípios de “manejo de pragas”, isto é, as decisões de controle devem ser tomadas considerando-se; i) o nível de ataque, ii) o número e o tamanho dos insetos-praga, e iii) o estágio de desenvolvimento da soja (Mesquita *et al.*, 1998). Para tanto, devem ser tomadas amostragens regulares para a quantificação da infestação. As amostragens devem ser realizadas com um pano-de-batida, de cor branca, preso em duas varas, com 1m de comprimento, o qual deve ser estendido entre duas fileiras de soja. As plantas das duas fileiras devem ser sacudidas vigorosamente sobre o mesmo, promovendo a queda dos insetos, que deverão ser contados. Esse procedimento deve ser repetido em vários pontos da lavoura, considerando, como resultado, a média de todos os pontos amostrados (Embrapa Soja, 2000).

Lagartas desfolhadoras (Anticarsia gemmatalis e Pseudoplusia includens): Devem ser controladas quando forem encontradas em média 40 lagartas grandes (>1,5 cm) por pano-de-batida ou com menor número se a desfolha atingir 30%, antes da floração, e 15% tão logo apareçam as primeiras flores. O Controle deve ser realizado preferencialmente por meio de Baculovírus caso a infestação seja de até 10 lagartas grandes/pano. Se o nível de infestação for maior, deve-se lançar mão de inseticidas químicos como Profenofós e Endossulfam (Campo & Saraiva, 2001).

Percevejos. O controle deve ser iniciado quando forem encontrados quatro percevejos adultos ou ninfas com mais de 0,5 cm por pano-de-batida. Diversos inseticidas, como Acefato, Carabril e Endossulfam, são indicados para o controle de percevejos (Embrapa Soja, 2000).

Tamanduá-da-soja (Sternechus subsignatos). Os danos são causados tanto pelos adultos, que raspam o caule e desfiam os tecidos, como pelas larvas, brocando e provocando o surgimento de galha. O controle químico desse inseto não tem sido eficiente. As larvas ficam protegidas no interior das galhas e os adultos, além de emergirem do solo por um longo período, ficam a maior parte do tempo sob a folhagem da soja nas partes baixas da planta. A rotação de culturas é a técnica mais eficiente para o seu manejo, mas sempre associada a outras estratégias, como o uso de inseticidas como Metamidofós e Fipronil (Embrapa Soja, 2000).

Fungos fitopatogênicos

A maioria dos fungos é transmitida através das sementes e, portanto, o uso de sementes sadias ou o tratamento das sementes antes da semeadura é essencial para a prevenção ou a redução das perdas. A expansão de áreas irrigadas nos Cerrados tem possibilitado o cultivo da soja no outono/inverno para a produção de sementes. Esse cultivo favorece a sobrevivência dos fungos causadores da antracnose, da ferrugem, do cancro da haste, da podridão branca da haste e da podridão vermelha da raiz (Embrapa Soja, 2001).

Cancro da haste (Diaporthe phaseolorum f.sp. meridionalis; Phomopsis phaseoli f.sp. meridionalis). Esses fungos são altamente dependentes de chuvas para disseminar os esporos dos restos de cultura para as plântulas em desenvolvimento. Quanto mais freqüentes forem as chuvas nos primeiros 40 a 50 dias após a semeadura, maior a quantidade de esporos serão liberados dos restos de cultura e atingirão as hastes das plantas. O controle da doença exige a integração de todas as medidas capazes de reduzir o potencial de inóculo do patógeno na lavoura. Assim o uso de cultivares resistentes, tratamento de semente, rotação/sucessão de culturas, manejo do solo com a incorporação dos restos culturais, escalonamento de épocas de semeadura, e adubação equilibrada são adotados (Embrapa Soja, 2000).

Antracnose (Colletotrichum dematium var. truncata). A antracnose é uma das principais doenças da soja nas regiões dos Cerrados. Sob condições de alta umidade, causa apodrecimento e queda das vagens, abertura das vagens imaturas e germinação dos grãos em formação. Pode causar perda total da produção, porém, com maior freqüência causa alta redução do número de vagens e induz a planta à retenção foliar e haste verde. É também possível que seja uma das principais causadoras da necrose da base do pecíolo que, nos últimos anos, tem sido responsável por severas perdas de soja nos Cerrados e cuja etiologia ainda não está esclarecida. A redução da incidência de antracnose, nas condições dos Cerrados, só será possível por meio de rotação de culturas, maior espaçamento entre as linhas (50 a 55 cm), população adequada (250.000 a 300.000 plantas/ha), tratamento químico de semente e manejo adequado do solo. O manejo da

população de percevejo é também importante na redução de danos por antracnose (Embrapa Soja, 2000).

Podridão vermelha da raiz (PVR) (Fusarium solani f.sp. glycines). O sintoma de infecção na raiz inicia com uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal, geralmente localizada um a dois centímetros abaixo do nível do solo. Essa mancha se expande, circunda a raiz e passa da coloração vermelho arroxeada para castanho-avermelhada a quase negra. Essa necrose acentuada localiza-se mais no tecido cortical, enquanto que o lenho da raiz adquire coloração, no máximo, castanho-clara, estendendo-se pelo tecido lenhoso da haste a vários centímetros acima do nível do solo. Nessa fase, observa-se, na parte aérea, o amarelecimento prematuro das folhas e, com maior frequência, uma acentuada necrose entre as nervuras das folhas. Informações disponíveis até o momento indicam que, com exceção de cultivares resistentes (Embrapa Soja, 2001), nenhuma prática agrônômica tem sido adequada para reduzir o impacto da doença, por isso, o Laboratório Planta-Praga I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem investigando peptídeos antimicrobianos endógenos do café que apresentam atividade contra *F. solani* (Souza, *et al.*, 2009), os quais, no futuro, poderão ser utilizados como alternativa biotecnológica para o controle desse patógeno.

Em 2001 uma nova doença foi detectada nos campos de soja brasileiros, a Ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, que logo se mostrou de difícil controle e capaz de causar perdas sem precedentes à produção. Maiores informações sobre esse novo patógeno e seu impacto na cultura da soja serão apresentadas no item I.VII.

I.VI.V. Biotecnologia aplicada à produção de soja

Dada a significativa competição no mercado internacional de soja, pesquisas inovadoras precisam ser implementadas para antecipar o aumento da demanda e assegurar o crescimento do mercado. A melhoria dos campos de soja por meio de técnicas de manejo e controle de pragas e doenças são prioridades óbvias. Os programas de melhoramento de soja também têm dado grande contribuição, através do desenvolvimento de cultivares de elite, e o Brasil se destaca nessa área, tanto que atualmente a produtividade dos campos de soja brasileiros é maior que a dos EUA (ver item I.VI.II). Contudo, uma nova questão começa a preocupar a comunidade científica voltada para produção agrícola: *Será que os ganhos genéticos necessários para o crescimento da produção de soja na magnitude necessária poderão ser alcançados pelas técnicas de melhoramento tradicionais?*

Um grande reservatório de diversidade genética encontra-se nas coleções de germoplasma de soja espalhadas pelo mundo em 20 diferentes países. Porém grande parte dessas coleções não é de domínio público (Carter *et al.*, 2004). Pesquisas genômicas com soja, que visam a análise e comparação de diferenças genômicas entre populações, podem, dentre outras coisas, promover um melhor entendimento sobre a regulação genética da composição dos constituintes das sementes, assim como beneficiar as estratégias de proteção contra perdas por pragas e doenças, ou mesmo o desenvolvimento de marcadores de DNA para genes de interesse (Wilson, 2008). A integração das ferramentas genômicas com as modernas técnicas de melhoramento convencional certamente levarão a uma mais eficiente utilização da diversidade genética da soja.

No final da década 1980 estudos moleculares começaram a ser realizados com a soja, os primeiros estudos visavam antes de tudo a análise da diversidade genética entre cultivares por meio de técnicas como RFLP (Apuya *et al.*, 1988). Mais tarde a técnica de RAPD foi utilizada para prever a distância genética entre 35 genótipos de soja (Thompson & Nelson, 1998). Em 2006, um consórcio entre o Departamento de Energia (DOE) dos EUA e o Departamento de Agricultura daquele país (USDA), iniciou o seqüenciamento do genoma da soja, cujos dados preliminares foram disponibilizados desde 2008 podendo ser consultados em <http://www.phytozome.net/soybean> (DOE/Joint Genome Institute, 2008). Em 2010 o seqüenciamento do genoma da soja foi publicado na prestigiada revista Nature (Schmutz *et al.*, 2010). Com esses avanços um número cada vez maior de pesquisas, com os mais diferentes enfoques passaram a ser reportadas, desde a identificação de genes envolvidos com o ciclo circadiano e o controle fotoperiódico da floração (Quecini *et al.*, 2007), passando pela análise de genes envolvidos com a sensibilidade à luz e a transdução de sinais (Quecini *et al.*, 2008), até o silenciamento de genes de soja induzido por vírus (Yamagishi & Yoshikawa, 2009). Estudos sobre a modulação da expressão gênica frente à patógenos, em especial o *P. pachyrhizi*, também foram realizados (Panthee *et al.*, 2007; Mortel *et al.*, 2007), e análises proteômicas, com diferentes intuitos, como a identificação de proteínas alergênicas (Santini *et al.*, 2008) e identificação de proteínas membranares relacionadas a estresse hídrico (Komatsu *et al.*, 2009), complementam a dinâmica das pesquisas de ordem moleculares associadas a programas biotecnológicos para o melhoramento da cultura da soja.

I.VII. A FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*)

I.VII.I. Aspectos microbiológicos

A espécie *Phakopsora pachyrhizi* pertence ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales e família Phakopsoracea. Fungos da ordem Uredinales são genericamente conhecidos como ferrugem, devido aos esporos vermelhos que produzem durante sua reprodução assexuada (Figura 16). As ferrugens ocorrem em muitas espécies de plantas parasitando-as, sendo comum uma espécie de ferrugem infectar apenas uma espécie de planta (Voegelé & Mendegen, 2003). O mecanismo de dispersão se dá pelo ar, sendo os esporos carregados pelo vento e podendo se propagar por centenas de quilômetros em poucos dias. Os aspectos microbiológicos do parasitismo entre os Uredinales e as plantas serão revistos a seguir.

Numa primeira etapa o esporo do fungo deve se fixar a superfície da planta. Para tanto, interações hidrofóbicas entre os esporos e a camada de cutina na superfície das células vegetais desempenham um papel fundamental. Neste momento, sinais desconhecidos causam a produção de macromoléculas mucilaginosas e hidrofóbicas chamadas adesinas. Uma vez fixado, o esporo irá germinar lançando seus tubos germinais indiscriminadamente sobre a superfície da planta até encontrar uma fenda estomática, quando então o crescimento passa a ocorrer perpendicularmente em direção ao interior do estômato (Dickinson, 2003). Será no estômato que se dará a formação do apresório a partir do qual ramos de infecção crescem para dentro da planta, por entre as células do mesófilo (Deising *et al.*, 2000). Em contraste com o mecanismo clássico de infecção de uredosporos apresentado, *P. pachyrhizi* penetra a folha diretamente através das células epidermais matando-as, ao invés de usar a abertura estomatal (Goellner *et al.*, 2010). Quando bem alocado, o fungo produzirá uma nova estrutura conhecida como austório, que se desenvolve a partir de uma célula mãe austorial para dentro da célula da planta. A membrana celular vegetal se invagina ao redor do corpo austorial e o espaço entre as duas membranas passa a ser denominado matriz extra-austorial. O austório contém em suas paredes transportadores de aminoácidos e hexoses bem como uma H⁺-ATPase para o transporte ativo de nutrientes da célula vegetal para o fungo (Voegelé & Mendegen, 2003).

Dentre as diversas famílias da ordem Uredinales, como Pucciniaceae, Melampsoraceae, Coleosporiaceae, Cronartiaceae, Phragmidiaceae e Pucciniastraceae; a Phakopsoraceae é conhecida por abrigar espécies parasitas de soja, como a *Phakopsora meibomiae*, conhecida como Ferrugem americana e detectada primeiramente no Brasil em 1979 (Deslandes, 1979) sendo inicialmente confundida com *P. pachyrhizi*. Mais tarde Carvalho e Figueredo repararam o



** Fonte: <http://plantbio.berkeley.edu>*

Figura 16: Esporo de um Uredinales em início de germinação. A cor avermelhada caracteriza a ordem.

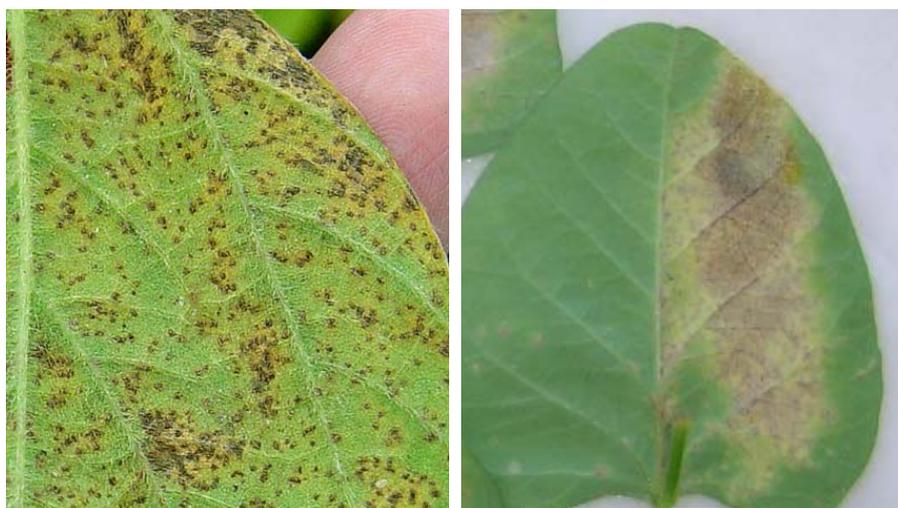
erro de classificação ao afirmar que naquela data a única espécie de *Phakopsora* presente no território brasileiro era a *meibomiae* (Carvalho & Figueredo, 2000), considerada menos agressiva que sua congênere que então devastava campos de soja pelo mundo, *Phakopsora pachyrhizi*. Esta nova espécie foi detectada nos campos brasileiros há quase dez anos, em 2001, quando gerou significativas baixas na produção tornando-se malagouradamente famosa entre produtores e os setores responsáveis pela fitossanidade dos campos brasileiros. Naquele ano o Brasil conheceu a terrível Ferrugem asiática da soja.

I.VII.II. A Ferrugem asiática como uma doença nos campos de soja

As condições de clima no Brasil, especialmente nas regiões, Sul, Sudeste e Centro-Oeste, são favoráveis a proliferação do *P. pachyrhizi*. Temperaturas em torno de 15 à 28 °C e umidade proporcionam um ambiente ideal para o fungo. Apesar da baixa umidade característica da região Centro-Oeste nos meses de julho a setembro, o abundante orvalho que se acumula nas folhas durante a madrugada é mais do que o necessário para a proliferação do *P. pachyrhizi*. Como constatado por Tschanz, o molhamento foliar é a mais importante condição para as etapas finais de epidemias (Tschanz, 1982). O período de latência varia em função da temperatura, sendo menor em temperaturas em torno de 23°C (Alves *et al.*, 2006). De maneira geral, condições ótimas para o cultivo da soja são consideradas favoráveis para o estabelecimento e desenvolvimento da doença (Neves, 2006).

Os sintomas iniciais da doença são pequenas lesões foliares de coloração castanha a marrom-escura na face abaxial da folha (Figura 17). As lesões tendem a um formato angular medindo de 2 à 5 mm de diâmetro, podendo aparecer em pecíolos, vagens ou caules (Sinclair & Hartman, 1999). Plantas severamente infectadas podem sofrer desfolha precoce, o que compromete a formação e o enchimento da vagem, bem como o peso final do grão. Estes sintomas se dão devido a danos no sistema fotossintético que comprometem a taxa de troca de carbono (Kumudini *et al.*, 2008), o que diminui a fixação do CO₂ atmosférico em carboidratos necessários ao metabolismo vegetal. Numa situação ainda pior pode acontecer aborto das flores ou queda total das vagens (Yang *et al.*, 1991).

A severidade da Ferrugem asiática salta aos olhos quando se considera sua rápida expansão e o montante de perdas que têm causado. Em 2001, a estimativa de área nos campos de soja afetada pela Ferrugem era de 10.000 ha (Neves, 2006) o que correspondia a algo entre 10 a 15% da área total brasileira. Na safra 2001/02 a doença já afetava 60% dos campos do



(A)

(B)

*Fonte: (A) <http://apsnet.org>; (B) arquivos do autor

Figura 17: *Phakopsora pachyrhizi* infectando folhas de soja. (A) “Close up” dos sintomas da Ferrugem asiática sobre a superfície abaxial de uma folha de soja. (B) Superfície abaxial de uma folha de soja em estado avançado de infecção por *P. pachyrhizi*.

Brasil, para mais tarde, na safra 2002/03 atingir 90% da área produtiva, gerando perdas acumuladas de quase 1 bilhão de dólares nessas duas últimas safras (Neves, 2006; Yorinori *et al.*, 2002, 2003). Apenas na safra 2003/04 as perdas alcançaram a marca de 1,2 bilhões de dólares (Yorinori *et al.*, 2004) e continuaram subindo até se estabilizarem na safra 2006/07, quando o prejuízo foi calculado em torno de 2,19 bilhões de Dólares (Soares, 2007), correspondendo a 17% da produção que alcançou saldo de 10,1 bilhões de Dólares na balança comercial, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2007). Passada uma safra, os avanços na prevenção e controle da doença alavancaram a produção dos campos brasileiros, e na safra 2008/09 o saldo da balança comercial para soja foi aumentado em mais de 60%, saltando para 16,8 bilhões de Dólares (Conab, 2009). Apesar do notável crescimento é difícil dizer o quanto este número está aquém da produtividade ótima dos campos brasileiros, visto que, é fato, a Ferrugem asiática continua como uma praga de difícil controle sobre a quase totalidade dos campos no Brasil.

Os avanços no entendimento sobre a biologia do *P. pachyrhizi* e os esforços aplicados para a prevenção e o controle da doença, seja por novas técnicas de manejo de fungicidas convencionais ou por obtenção de cultivares que apresentam alguma resistência ao fungo serão apresentados no tópico a seguir, onde também serão apresentadas medidas alternativas que, por enquanto, ainda não estão disponíveis para os produtores brasileiros.

I.VII.III. O controle da Ferrugem asiática

Após detectada no país pela primeira vez em 2001, a Ferrugem asiática proliferou-se como a verdadeira praga que é alastrando prejuízos pelos campos brasileiros. Atônitos, produtores e autoridades fitosanitárias descabidos de consultoria apropriada e efetiva, despendiam esforços que logo se mostraram em vão, e da varanda das casas os produtores viram nas três safras seguintes a produtividade dos seus campos despencar. Apenas para constar, na safra 2005/06, quando o susto inicial já havia passado e os produtores já lutavam ferrenhamente contra aquele agora conhecido inimigo letal, a queda na produção ainda foi de 4,5% (Neves, 2006). Apenas na safra seguinte uma medida mais enérgica foi tomada. Com a intenção de diminuir o problema os estados do Mato-Grosso e Goiás apresentaram instruções normativas que instituíam períodos de “vazio sanitário” de 90 dias entre a colheita da soja e a semeadura de verão na qual deveria haver ausência de plantas de soja nos campos. Tal medida, sabia-se, seria pouco eficaz devido a capacidade do fungo de sobreviver em outras plantas, porém a intenção era que a prática atrasasse a ocorrência da doença, evitando principalmente a ocorrência nos

estágios vegetativos, reduzindo a pressão da doença nas primeiras semeaduras da safra (Zambolin, 2006). Aliada ao uso de cultivares precoces, o “vazio sanitário” obteria resultados melhores.

As medidas de controle recomendadas para amenizar os prejuízos englobavam ações preventivas de manejo, que além do “vazio sanitário” associado à utilização de cultivares precoces, incluíam semeio no início da época de plantio da região, evitar cultivo de soja irrigada na entressafra, evitar a presença de soja guaxa e de hospedeiros alternativos de *P. pachyrhizi* nas proximidades da área de plantio e instalações de unidade de alerta, que consistiam em áreas de 100 m² semeadas 20 dias antes da época normal de plantio de soja para inspeções sistemáticas (Benchimol *et al.*, 2005).

Tão logo a doença surgiu no Brasil iniciaram-se estudos de seleção de linhagens ou variedade resistentes/tolerantes a *P. pachyrhizi*. Como resultado, variedades denominadas “inox”, como a FT-2, foram obtidas, porém na safra 2002/03 essa resistência foi logo quebrada, mostrando que a variabilidade genética do patógeno exigia maiores esforços para a obtenção de cultivares resistentes de soja. Estudos posteriores mostraram que dentre os quatro genes de resistência já identificados para as linhagens de ferrugem prevalentes nos EUA e na Ásia, apenas dois (*Rpp2* e *Rpp4*) surtiam algum efeito contra a Ferrugem encontrada nos campos brasileiros. Materiais exóticos, não adaptados as condições brasileiras, e portadores dos genes em questão, foram utilizados em programas de melhoramento convencional para a obtenção de novas linhagens resistentes (Calvo *et al.*, 2007) e novos cultivares exóticos resistentes continuaram a ser desenvolvidos em diversas partes do mundo. Em Uganda duas variedades altamente resistentes foram desenvolvidas há pouco tempo (Oloka *et al.*, 2009), porém ainda é cedo para saber se essa resistência se perpetuará ao longo de gerações de hospedeiros e patógenos. Devido a experiência anterior, sabe-se que a resistência a *P. pachyrhizi* pode ser facilmente quebrada, por isso o controle químico tem se mostrado a medida mais adequada para a contenção dessa doença. Os fungicidas de uso mais comum contra a Ferrugem são: Mancozeb, Benzimidazol, Triazol e Strobirulinas. Recentemente Scherm e colegas mostraram que uma combinação específica desses fungicidas é capaz de reduzir a incidência da doença em até 58% (Scherm *et al.*, 2009). Em contrapartida estes químicos são relacionados a desordens de ordem neurológica, imunológicas e reprodutivas em mamíferos (Filipov and Lawrence, 2001; Whittaker & Faustman, 1992), bem como mostraram-se tóxicos para algas e invertebrados aquáticos (Ochoa-Acuna *et al.*, 2009), representando então uma abordagem de riscos a saúde pública e ambiental.

Até o momento, iniciativas biotecnológicas para o controle da Ferrugem asiática ainda não geraram benefícios disponíveis ao produtor. Técnicas moleculares para a transferência direta de genes de resistência, como o *Rpp4*, para cultivares adaptadas as condições brasileiras ainda não geraram nenhuma variedade transgênica comerciável. Contudo, projetos de pesquisa encontram-se em pleno andamento em centros como a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde moléculas com potencial antifúngico vem sendo testadas contra a Ferrugem asiática (Vasconcelos *et al.*, 2010).

I.VII.IV. Possibilidades biotecnológicas para o controle da Ferrugem asiática

É notável a carência de estudos com abordagens biotecnológicas visando o controle da Ferrugem asiática. A maioria esmagadora das publicações foca no monitoramento do desenvolvimento da doença, na avaliação das perdas de campo, em estudos de hospedeiros, em desenvolvimento de modelos de risco e, talvez o maior tópico pesquisado, na busca por fontes de resistência.

Um passo importante para uma frente biotecnológica de combate a Ferrugem asiática foi dado em 2005 quando Buitrago e Frederick construíram uma biblioteca de cDNA de uredinósporos de *P. pachyrhizi* em germinação identificando mais de 480 genes que codificam para possíveis alvos moleculares que atuam nas primeiras etapas do processo de infecção (Buitrago & Frederick, 2005). Dentre eles o gene que codifica para a zonadesina, envolvida na adesão do esporo a superfície da planta; os genes que codificam para α -tubulinas e *N*-acetilglicosaminidases, envolvidos no crescimento do tubo germinal; ou genes que codificam proteínas que atuam no transporte de nutrientes da célula vegetal para o fungo via matrix-austorial, como uma (H^+) ATPase de membrana plasmática. Todos esses foram encontrados na biblioteca de cDNA de Buitrago e Frederick. Em um estudo semelhante Tremblay e colegas evidenciaram ainda mais a importância da α -tubulina nos primeiros 10 dias de infecção quantificando a expressão desse gene para a determinação do padrão de variação de biomassa do fungo nos primeiros estágios da infecção (Tremblay *et al.*, 2009).

Aspectos importantes sobre a interação molecular de *P. pachyrhizi* com uma planta não hospedeira, a cevada, foram desvendados por Hoefle e colegas. Quando inoculado sobre a superfície daquele vegetal o fungo causa apenas pequenas manchas necróticas típicas de interação não compatível, que envolve a resposta hipersensitiva vegetal de morte celular. Análises microscópicas mostraram que na tentativa de infecção o apressório era formado na

superfície das células epidermais, e não dentro dos estômatos ou em fendas periclinais da parede celular, como é típico dos fungos da classe Uredinales (ver item I.VI.I), devido a camadas extras de calose ali depositadas pelas células epidermais. Essa resistência está relacionada com os genes *ROR1* e *2* de cevada. Os dados de Hoefle sugerem que *P. pachyrhizi* deva manipular a morte programada das células epidermais facilitando a penetração do fungo até alcançar as células do mesófilo, pois a alta expressão de um gene inibidor de morte celular em cevada, *BAX* inibitor-1, foi capaz de conter a infecção (Hoefle *et al.*, 2009).

Além dos genes detectados por Buitrago e Fredrick, bem como os relatados por Hoefle, certamente bons alvos para uma abordagem biotecnológica de contenção da Ferrugem asiática, genes envolvidos na degradação da parede celular vegetal, como os codificantes de celulases, xilanases e pectinases, também são alvos moleculares em potencial para o controle da doença. Se for levada em consideração a dinâmica de infecção descrita por Hoefle, mesmo após a indução da morte das células epidermais vegetais, o fungo necessitaria ainda de enzimas degradadoras da parede celular para penetrar a camada de calose ali depositada.



II. JUSTIFICATIVA

Justificativa

Em países com grande potencial agrícola, como o Brasil, o aprimoramento das técnicas de produção são fundamentais para o desenvolvimento do agronegócio e da economia como um todo. Para os modernos sistemas de produção, apenas as técnicas tradicionais de manejo dos campos não são suficientes para promover a competitividade do produto agrícola no mercado internacional. Nos últimos 10 anos a aplicação da biotecnologia na agricultura foi de fundamental importância para a manutenção do crescimento da produção e estabilização dos preços no mercado. A tecnologia do DNA recombinante muito contribuiu para isso, visto a grande variedade de cultivares transgênicos, mais produtivos que os tradicionais, procurados pelos produtores atualmente. Algodão, soja, milho, arroz são apenas alguns exemplos de cultivares para os quais os produtores já dispõem de variedades transgênicas no mercado mundial.

No que diz respeito a obtenção de cultivares agrícolas resistentes a pragas e doenças, as técnicas biotecnológicas se destacam em relação ao melhoramento tradicional por permitir a inserção direta de genes de resistência nos organismos alvo, mesmo que esses genes sejam oriundos de espécies filogeneticamente distantes. Para tanto, a prospecção de genes para o uso em programas de melhoramento genético deve ser uma prioridade para os países com potencial biotecnológico como o Brasil, os quais podem desenvolver produtos para sanar suas próprias necessidades. Se tomarmos como exemplo o caso do algodoeiro, a maior parte das variedades transgênicas atualmente no mercado, como os Bollgard I e II, e o WideStrike, apresentam resistência a insetos da ordem lepidóptera, como a *Helicoverpa spp.*, uma praga comum nos Estados Unidos. Estes produtos não se adequam totalmente aos produtores de países como o Brasil, onde a principal praga do algodoeiro é um inseto da ordem Coleóptera denominado bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*).

Tendo isso em vista, esta tese apresenta o resultado de um programa de prospecção que visava: i) encontrar novas proteínas entomopatogênicas na cepa S811 de *Bacillus thuringiensis*, e que estivessem relacionadas à toxicidade dessa cepa ao Bicudo-do-algodoeiro; ii) avaliar a atividade de uma proteína inibidora de xilanase, codificada por um gene parálogo ao gene codificador de uma quitinase de classe III de café (*Coffea arabica*), contra o fungo causador da Ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*).

III. HIPÓTESE

Este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de se testar as seguintes hipóteses:

- i) Estaria a toxicidade da cepa S811 de *Bt* para *A. grandis* relacionada unicamente às toxinas sabidamente produzidas por ela: Cry1A, Cry1I, Cry8H?
- ii) Atividade quitinolítica desempenha algum papel na toxicidade da cepa S811 de *Bt* para insetos?
- iii) A fusão de uma toxina Cry com uma quitinase geraria uma molécula recombinante com maior atividade inseticida?
- iv) Qual a pressão evolutiva levaria a manutenção da expressão de genes de quitinases inativadas em resposta a estresse biótico em plantas?

IV. OBJETIVOS

IV.I. OBJETIVO GERAL

Encontrar novos genes com potencial para utilização em programas biotecnológicos que visem à contenção da ocorrência de pragas durante o cultivo de Algodão e Soja.

IV.II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Busca por novos genes codificadores de proteínas entomotóxicas na cepa S811 de *Bacillus thuringiensis* e que tenham atividade contra o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*).

- Construção de uma proteína de fusão composta por uma quitinase e uma toxina Cry; e avaliação da atividade dessa molécula contra *A. grandis*.

- Avaliação da atividade de uma proteína inibidora de xilanase codificada por um gene parálogo a um gene codificador de uma quitinase de classe III de café contra o fungo *Phakopsora pachyrhizi* causador da Ferrugem asiática da soja.

V. CAPÍTULO 1

PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA PATOGENICIDADE DO *Bacillus thuringiensis* (S811) CONTRA O BICUDO-DO- ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*; COLEOPTERA)

V.I. INTRODUÇÃO AO PRIMEIRO CAPÍTULO

Como todas as culturas o algodão está sujeito ao ataque de pragas. No Brasil, dentre as 10 pragas mais comuns nos campos de algodão, é o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera) (Figura 13) a que apresenta o maior potencial de dano, pois se abate sobre a planta durante diversas fases do seu desenvolvimento, atacando e danificando o botão floral (Papa, 2006). No que diz respeito à utilização de *Bt* para o controle de pragas do algodão, diversas cepas apresentam-se como uma boa alternativa devido à atividade contra insetos da ordem Lepidóptera, como o Curuquerê (*Alabama argillacea*), a Lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), a Lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a Lagarta militar (*Spodoptera frugiperda*). Porém, cepas ativas contra Coleópteros, como o Bicudo, são mais raras na natureza (Espinasse *et al.*, 2003). Este fato expõe a importância de programas de prospecção de novas toxinas Cry para a utilização nos campos brasileiros visando controle do Bicudo-do-algodoeiro.

Em 2005, variedades transgênicas de algodão resistente a insetos foram liberadas para o plantio em território brasileiro (Diário Oficial da União, 2005), o que representou mais uma alternativa de controle para os produtores. Porém, a maior parte dos cultivares transgênicos atualmente no mercado, como os Bollgard I e II, que expressam as proteínas Cry1Ac e Cry1Ac + Cry2Ab respectivamente; e o WideStrike, expressando as proteínas Cry1Ac + Cry1F, apresentam resistência a insetos da ordem lepidóptera, como a *Helicoverpa spp.*, uma praga comum nos Estados Unidos, onde os benefícios da utilização de algodão transgênico variam de 150 à 250 milhões de dólares anualmente (Frisvold & Reeves, 2008). Contudo, esses produtos não se adequam totalmente aos produtores do Brasil, onde a principal praga é Bicudo-do-algodoeiro. Tendo isso em vista, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem aplicando esforços para a produção de variedades de algodão GM resistentes ao Bicudo-do-algodoeiro.

Um grande número de cepas de *Bt* está catalogado no Banco de Germoplasma de *Bacillus spp.* (BGB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e da Embrapa Milho e Sorgo. Uma delas, a cepa S811 apresenta atividade inseticida contra larvas do Bicudo-do-algodoeiro. Alguns genes *cry* foram identificados nessa cepa, sendo eles o *cry8Ha*, *cryIIa12* e *cryIAb* (Martins *et al.*, 2007, Grossi-de-Sa *et al.*, 2007). Além desses, como será mostrado aqui pela primeira vez, também o gene codificador da toxina VIP3A está presente na cepa S811. Contudo, pouco é conhecido sobre a regulação da expressão desses genes ao longo do ciclo celular da bactéria e o quanto realmente cada um desses genes está envolvido na atividade contra Coleópteros. Aqui será jogada alguma luz sobre a expressão temporal e espacial dos genes dessas toxinas, relacionando-os com a atividade inseticida encontrada nas proteínas

celulares, nas proteínas de esporos e nas proteínas liberadas no meio de cultura em diferentes estágios e locais durante o cultivo do *Bt* S811. Para tanto, foi realizado por meio de Western blot com anticorpos Anti-Cry1A, Anti-Cry8H, Anti-Cry1I e Anti-VIP3A um estudo da cinética de síntese das toxinas reconhecidas por esses anticorpos nas frações protéicas celulares (incluindo esporos) e frações protéicas do sobrenadante da cultura. Adicionalmente, mapas protéicos obtidos por eletroforese bidimensional permitiram a determinação da cinética de síntese de mais de 500 proteínas ao longo do cultivo do *Bt* S811. Dentre essas proteínas 12 foram identificadas por espectrometria de massa. A cinética de síntese das toxinas e das demais proteínas identificadas pôde ser relacionada à atividade tóxica para *A. grandis* observada em diferentes etapas do cultivo da cepa S811, seja na fração protéica do sobrenadante seja na fração celular. Adicionalmente, ensaios de atividade enzimática mostraram que uma determinada fração protéica com atividade para o *A. grandis* também apresentava altos índices de atividade quitinolítica, um indício de que esse tipo de atividade enzimática deva contribuir para a toxicidade da cepa contra o Bicudo-do-algodoeiro.

V.II. METODOLOGIA

V.II.I. Cultivo do *Bacillus thuringiensis* S811

A cepa bacteriana foi obtida do Banco de Germoplasma de *Bacillus spp.* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Uma colônia foi utilizada para inocular 20 mL de meio Caldo Nutritivo (Apêndice 2) como Pré-inóculo, o qual foi mantido a 28 °C por 12 horas sob agitação de 200 rpm até a Densidade Óptica (O.D. 600 nm) atingir 2.0 – 2.5 quando medida através de uma cuveta de 1 cm. Foram utilizados 10 mL do pré-inóculo para inocular 200 mL de meio Caldo Nutritivo. A cultura foi mantida a 28 °C sob agitação de 200 rpm em frascos Erlenmeyers de 2 L. O crescimento foi interrompido as 8, 16, 24 e 32 horas após a inoculação (HAI) para extração de proteínas.

V.II.II. Extração de proteínas e purificação de cristais

Para a extração de proteínas celulares foi utilizada uma modificação do método descrito por Schimd (Schimd *et al.*, 1997). As células foram precipitadas por centrifugação a 1.200 g por 5 min e lavadas duas vezes com tampão Tris/EDTA (Apêndice 1). O meio que compunha o sobrenadante da cultura foi denominado Extrato Bruto do Sobrenadante. O sedimento da cultura foi resuspenso em 40 mL de Tampão de Sonicação (Apêndice 1) e as células foram rompidas por sonicação com uma sonda de 5 mm e 3 pulsos de 30 W aplicados durante 1 min com intervalos de 30 segundos. Todo o procedimento foi realizado a 4° C. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 1.200 g por 5 minutos. Esse sobrenadante foi chamado Extrato Bruto do Sedimento. Para a realização dos bioensaios ambos os extratos brutos foram dialisados contra água em câmara fria e então liofilizados. Para as eletroforeses os extratos brutos foram precipitados com 10% de TCA v/v durante 2 horas a -20 °C, sendo então centrifugados a 13.000 g por 90 minutos. O material precipitado foi lavado com acetona gelada e secado a vácuo. O conteúdo protéico das frações celulares e do sobrenadante foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

As inclusões cristalinas foram purificadas utilizando-se o método descrito por Thomas e Ellar (Thomas & Ellar, 1983). As bactérias foram mantidas em meio Agar Nutritivo (meio Caldo Nutritivo contendo Agar 1,5%) à 30 °C por 48 horas. Com o auxílio de uma alça de platina as bactérias foram coletadas, depositadas em 1 mL de água destilada e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 10 °C. As células precipitadas foram lavadas 3 vezes com PMSF 0,1 mM, Triton X-100 0,01% e resuspensas em 2-5 mL de Triton X-100 0,1%, Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,01 M pH 8.0 e sonicadas (sonda de 5 mm; 3 pulsos de 30 W aplicados durante 1 min

com intervalos de 30 segundos). A mistura de esporos e cristais foi fracionada por centrifugação em um gradiente descontínuo de sacarose contendo 7 mL de cada concentração (67, 72, 79 e 84% m/v) em Triton X-100 0,01%, Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,01 M, pH 8.0. A centrifugação foi realizada a 47.800 g por 30 minutos a 15 °C. As bandas nas interfaces foram coletadas, lavadas uma vez com o mesmo volume de Triton X-100 0,01% e centrifugadas a 12.800 g por 10 minutos a 15 °C, sendo então resuspensas em PMSF 0.1 mM. Os cristais foram mantidos à – 20 °C até a utilização.

V.II.III. Bioensaios com larvas neonatas de *Anthonomus grandis*

Para o bioensaio contra larvas neonatas de *A. grandis*, 500 µg de proteínas totais de cada estágio (8, 16, 24 e 32 HAI) foram solubilizados em 500 µL de água destilada e incorporados a 5 mL de uma dieta artificial⁵ que foram depositados em um poço de uma placas de seis poços. Após a gelificação da dieta 10 orifícios com aproximadamente 0,5 cm de profundidade foram feitos com o auxílio de ponteiros descartáveis na superfície da dieta encontrada em cada poço. Uma larva foi acomodada em cada orifício e as placas foram mantidas a 27 °C (+/- 1 °C) e 60% U.R. O número de larvas mortas foi determinado 8 dias após o início do ensaio. Como controle negativo foi utilizado 500 µL de água destilada incorporada a dieta artificial. Cada ensaio foi conduzido em triplicata.

V.II.IV. Eletroforese e Western blot

Ensaios eletroforéticos foram realizados em um sistema Mini-Protean (Bio-Rad) com SDS-PAGE, 4% gel de aplicação / 12,5% gel principal e Tampão de Corrida Tris/Glicina (Apêndice 1) (Laemmli, 1970). As condições elétricas foram de 12 mA enquanto a amostra percorria o gel de aplicação e 15 mA durante a corrida pelo gel principal. O tempo de corrida foi de 30 – 40 min. Para cada ensaio foram realizadas duas eletroforeses, uma delas para coloração com Commassie Blue-R e outra para os procedimentos de eletrotransferência. No caso dessa última, após a eletroforese os géis eram incubados por 10 min em Tampão de Transferência (Apêndice 1) sob agitação lenta. Para as análises por Western blot (Towbin *et al.*, 1979) foram utilizadas membranas de nitrocelulose Hybond-C (G.E. Healthcare). Os procedimentos de eletrotransferência foram realizados em um sistema semi-seco Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) com 0.05 V/gel durante uma hora. Após a transferência as membranas foram

⁵ Parte autoclavada: Agar 20 mg/mL, Levedo de Cerveja 30 mg/mL, Proteína de Soja 50 mg/mL, Gérmen de Trigo 30 mg/mL, Pharmamédia 20 mg/mL, H₂O *q.s.p.* 40 mL. Parte não autoclavada: Ácido sórbico 1,2 mg/mL, Ácido ascórbico 10 mg/mL, Glicose 30 mg/mL, Nipagina 1 mg/mL, Sais minerais 5 mg/mL, Solução vitamínica 5 µL/mL.

incubadas em 10 mL de Solução Bloqueadora composta por Tampão PBS (Apêndice 1) contendo 5% m/v de leite desnatado por 45 min sob agitação suave. Depois do bloqueio cada uma das membranas foi incubada por 45 min com um dos anticorpos policlonais a seguir: Anti-Cry8H, Anti-Cry1I e Anti-VIP3 diluídos em Solução Bloqueadora na proporção de 1:1000 v/v e num volume final de 10 mL. Anticorpos monoclonais Anti-Cry1A foram utilizados na diluição 1:200 v/v. Anticorpos conjugados a Fosfatase Alcalina (Bio-Rad) foram utilizados como segundo anticorpos na diluição 1:1000 v/v e em volume final de 10 mL, onde as membranas foram incubadas por 45 min sob agitação lenta. Entre as incubações, e antes do desenvolvimento da reação, as membranas foram lavadas cinco vezes com 40 mL de Solução Bloqueadora contendo Tween-20 0,1% por 5 min sob agitação lenta. As reações foram desenvolvidas utilizando-se o Kit AP Conjugate Substrate (Bio-Rad).

V.II.V. Eletroforese Bidimensional e processamento de imagens

Focalização Isoelétrica (IEF). Foram utilizados géis com gradiente imobilizado de pH (Géis IPG) de 18 cm (G.E. Healthcare). Oitocentos microgramas de cada amostra (8, 16, 24 e 32 HAI das frações celulares e do sobrenadante) foram solubilizados em 350 µL de Solução de Rehidratação (Apêndice 1) e aplicados no gel durante o procedimento de rehidratação destes. Os Géis IPG foram reidratados durante a noite em um “*Reswelling Tray*” (G.E. Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. A focalização Isoelétrica foi realizada em um IPGphor III (G.E. Healthcare) e as condições elétricas foram as definidas pelo fabricante de acordo com o comprimento dos géis e o intervalo de pH dos mesmos.

SDS-PAGE. Findada a IEF, os géis de IPG foram equilibrados de acordo com as instruções do fabricante e lavados rapidamente com Tampão de Corrida Tris/Glicina. Após isso os géis de IPG foram acomodados no topo do gel de poliacrilamida da segunda dimensão e fixados com agar 0,5% m/v e traços de Azul de Bromofenol solubilizados em Tampão de Corrida. A segunda dimensão foi realizada em um sistema Ettan Dalt Six (G.E. Healthcare). Foram utilizados géis de poliacrilamida 12,5% cuja composição era descrita pelo fabricante. O sistema foi alimentado por uma fonte EPS 3501-XL (G.E. Healthcare) e a corrida aconteceu em duas etapas onde as condições elétricas eram de i) 5 Watts/gel durante 30 min e ii) 17 Watts/gel até o indicador (Azul de Bromofenol) alcançar a base do gel, aproximadamente 4h 30 min. Todo o procedimento ocorreu sob refrigeração à 15 °C. Ao final os géis foram corados durante a noite com 250 mL de Solução Corante Commassie Blue-R por gel, e descorados com a mesma solução carecendo de Commassie Blue-R.

Análise de Imagens. As imagens das triplicatas dos géis bidimensionais foram obtidas com resolução de 300 dpi por um escaner Image Master Scanner III (G.E. HealthCare). Análises quantitativas, qualitativas e estatísticas dos padrões bidimensionais foram realizadas com o software Image Master 2D Platinum (G.E. Health Care). Para a detecção dos spots foram utilizados os seguintes parâmetros: “Smooth”: 2; Saliência: 200; Área mínima: 4. O índice de correlação entre os géis variou de 0,9882 a 0,7683.

V.II.VI. Excisão de spots, digestão trípica e espectrometria de massa para identificação de proteínas

As proteínas resolvidas por eletroforese foram identificadas tanto por sequenciamento *de novo* dos fragmentos trípticos (*Seqüenciamento MS/MS*) quanto por *Peptide Mass Fingerprint* (PMF).

As proteínas de interesse foram excisadas dos géis e digeridas com tripsina (Mass Spectrometry Grade - Promega) seguindo a metodologia descrita por Rosenfeld (Rosenfeld *et al.*, 1992). Ao hidrolisado trípico foi adicionada matriz alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico na proporção de 1:1 m/v. Aliquotas de 1 µL foram aplicadas na placa de MALDI de um Espectrômetro de Massa Ultraflex II - Bruker Daltonics. Para o sequenciamento MS/MS a tolerância de massa foi de 0,15 Da para as massas dos peptídeos precursores. A ferramenta de busca MProch (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/MProch/index.html>) foi utilizada para acessar o banco de dados Uniprot. A matriz 250 PAM foi utilizada nas buscas de peptídeos por homologia. Para a identificação por *Peptide Mass Fingerprint*, as listas de massas dos fragmentos trípticos obtidas foram analisadas com o software MASCOT Daemon (<http://www.matrixscience.com>) (Matrix Science, London, UK) em busca de similaridades de massas nos padrões de digestão. As buscas foram realizadas com acurácia de massa de +75 ppm, e “All taxa” foi escolhido como categoria taxonômica. Resíduos de cisteínas carbamidometilados foram considerados como modificações fixas. As buscas foram realizadas no banco de dados Swissprot.

V.II.VII. Ensaio de atividade quitinolítica

Para a determinação da atividade quitinolítica, 500 µg de proteínas de cada amostra (8, 16, 24 e 32 HAI das frações celulares e do sobrenadante) foram adicionados a 1 mg do substrato colorimétrico Chitin Azure (Sigma) em 500 µL de tampão Tris/HCl (Tris 1,5 M pH 8.8 com HCl). A reação ocorreu durante a noite a 37 °C sob agitação lenta. O material foi centrifugado a 10.000 g por 5 min e a absorbância foi medida a 595 nm através de uma cuveta de 1 cm.

V.III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.III.I. Crescimento bacteriano e síntese de proteínas

Os aspectos do crescimento e esporulação da cepa S811 de *Bt* foram analisados considerando quatro momentos do crescimento da cultura, sendo eles: 8, 16, 24 e 32 horas após a inoculação (HAI). Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase, juntas aos dados de densidade óptica da cultura, permitiram a classificação dos quatro momentos como: 8 HAI – estágio vegetativo, quando o crescimento exponencial tem início; 16 HAI – início da formação dos esporos; 24 HAI – quando é possível ver esporos e cristais dentro das células; e 32 HAI – início do processo de esporulação, quando é possível ver esporos e cristais livres no meio (Figura 18). Em cada um desses estágios o conteúdo protéico das células e do sobrenadante da cultura foram analisados separadamente.

A cepa S811 apresenta um interessante comportamento microbiológico. Nas primeiras 24 horas de seu crescimento as células se encontram predominantemente como diplobacilos. Já a partir das 32 horas em diante elas estarão arranjadas como streptobacilos (dado não mostrado). Sarrafzadeh e colaboradores mostraram um comportamento similar no sorotipo H14 de *B. thuringiensis*, que também apresentava a conformação de diplobacilo por volta das 14 horas do início do processo de fermentação. O mesmo sorotipo, ao alcançar as 23 h de fermentação, apresentava-se na conformação de streptobacilo (Sarrafzadeh *et al.*, 2005).

A Fase Lag ocorre antes das primeiras 8 HAI, quando então a cultura entra na Fase Log apresentando um crescimento exponencial e um aumento no conteúdo protéico (Figura 19). As 16 HAI é possível ver esporos dentro das células, contudo a esporulação ainda não ocorre. Esse ponto marca o final da Fase Vegetativa e a entrada da cultura na Fase Estacionária, a qual procede até as 32 HAI, quando a esporulação tem início e a cultura começa a declinar. De acordo com Avignone-Rossa e Sarrafzadeh o crescimento linear que se inicia nessa etapa se dá devido aos níveis de oxigênio dissolvido (Avignone-Rosa & Mignone, 1995; Sarrafzadeh *et al.*, 2005) e também se inicia por volta das 10 HAI no crescimento do serovar H14. Das 32 HAI em diante há quase que totalmente apenas esporos e cristais no meio de cultivo da cepa S811, não havendo metabolismo celular, por isso estágios posteriores a 32 HAI foram desconsiderados nesse estudo.

Uma curva de concentração de proteínas foi construída de acordo com o conteúdo protéico das células/esporos (fração celular) e do sobrenadante da cultura (fração sobrenadante) em cada um dos estágios analisados. Na fração celular o conteúdo protéico aumenta exponencialmente na Fase Log até atingir um máximo de 260 µg/mL às 16 HAI, depois disso

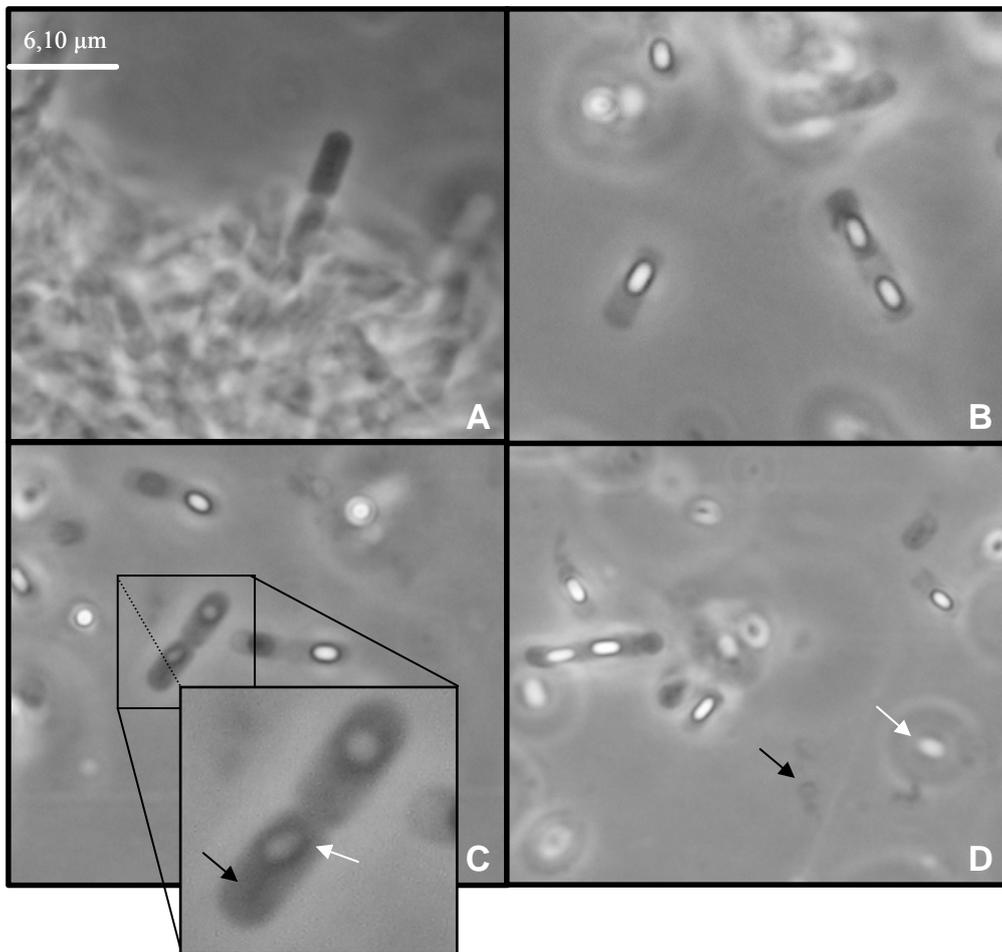


Figura 18: Aspectos de uma cultura de *Bacillus thuringiensis* S811 vista por microscopia de contraste de fase. A) 8 horas após a inoculação (HAI) – estágio vegetativo, quando o crescimento exponencial tem início; B) 16 HAI – início da formação dos esporos; C) 24 HAI – quando é possível ver esporos (seta branca, no zoom) e cristais (seta preta, no zoom) dentro das células; D) 32 HAI – início do processo de esporulação, quando se observa esporos (seta branca) e cristais (seta preta) livres no meio.

sofre uma queda abrupta ao começo da Fase Estacionária e durante o processo de esporulação (Figura 19). Diferentemente, o conteúdo protéico da fração do sobrenadante mantém um aumento linear até atingir um máximo de 270 µg/mL às 32 HAI, permanecendo em níveis elevados até o final da cultura, quando uma leve queda, devido à degradação natural, é observada (Figura 19). O coeficiente de absorvância e o conteúdo protéico dos esporos são menores do que os das células vegetativas. Além de todas as proteínas envolvidas na produção das inclusões cristalinas e daquelas liberadas no meio, o conteúdo protéico dos esporos é restrito a alguns tetra e pentapeptídeos componentes da parede celular de peptidoglicano do invólucro do esporo e algumas proteínas do invólucro do esporo (*spore coat proteins*). Até mesmo essas últimas podem ser encontradas em abundância livres no meio, como a *Spore Coat Protein E*, mostrada na figura 26 e na tabela 6.

V.III.II. Análise temporal da síntese de toxinas durante o cultivo de *B. thuringiensis* S811 e atividade contra *A. grandis*

Todas as amostras das frações protéicas celulares e do sobrenadante foram resolvidas por SDS-PAGE (Figura 20-A, B) e utilizadas em análises por Western blot com anticorpos AntiCry1A, AntiCry8H, AntiCry1I e AntiVIP3A. Os cristais purificados de uma cultura com 72 HAI também foram resolvidos por SDS-PAGE (Figura 20-C). Dentre as quatro toxinas *Bt* analisadas, todas foram predominantemente encontradas na fração celular, mais precisamente das 16 às 32 HAI (Figura 21-A, B, C, D), sendo Cry1A a primeira a ser liberada no meio às 32 HAI (Figura 21-A). A mesma proteína compõe a maior parte dos cristais obtidos pelos procedimentos de purificação (Figura 20-C). A Proteína Inseticida Vegetativa VIP3A foi encontrada exclusivamente as 16 HAI na fração celular (Figura 21-B). Cry8H mostrou um máximo de acúmulo as 16 HAI na fração celular (Figura 21-C), após o que sua quantidade diminuiu, sendo ainda encontrada em pequena quantidade dentre os cristais purificados (Figura 20-C). Cry1I teve sua produção aumentada das 16 às 32 HAI na fração celular (Figura 21-D), não sendo liberada no meio até as 32 HAI. Ela não foi encontrada entre os cristais purificados por ser uma proteína solúvel que não faz parte dos cristais de *Bt* (Escudero *et al.*, 2006; Maagd *et al.*, 2003). A décima sexta hora após a inoculação da cultura parece ser um momento chave no crescimento do *Bt* S811, quando todas as quatro toxinas analisadas são encontradas na fração celular. Para o serovar H14, a primeira toxina Cry também começa a ser sintetizada às 16 HAI, antes da etapa de esporulação (Sarrafzadeh *et al.*, 2005). Bioensaios com *A. grandis* mostraram que às 16 HAI da fração celular observa-se atividade inseticida (Figura 22). Toxinas Cry8 e

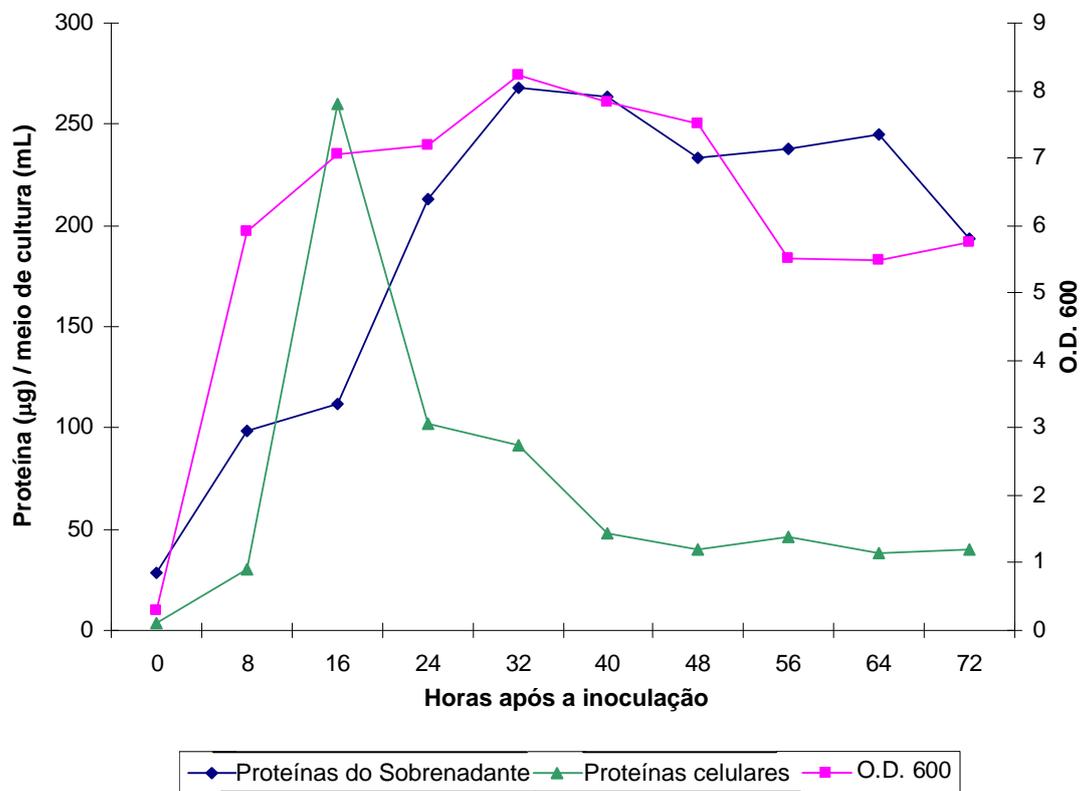


Figura 19: Caracterização do crescimento de uma cultura de *B. thuringiensis* S811. Até as 16 HAI há um aumento exponencial na população de células e no conteúdo protéico das células e do meio de cultura. Depois de então a cultura entra na fase estacionária, no final da qual inicia-se o processo de esporulação. Proteínas não envolvidas na formação dos cristais são liberadas no meio. Depois das 32 HAI a cultura encontra-se composta quase que exclusivamente por esporos, os quais possuem coeficiente de absorvância menor que o das células. Neste ponto inclusive os cristais protéicos foram liberados no meio. O conteúdo protéico dos esporos é mínimo e pode ser restrito a proteínas do invólucro do esporo e peptídeos na parede celular de peptidoglicano do invólucro do esporo.

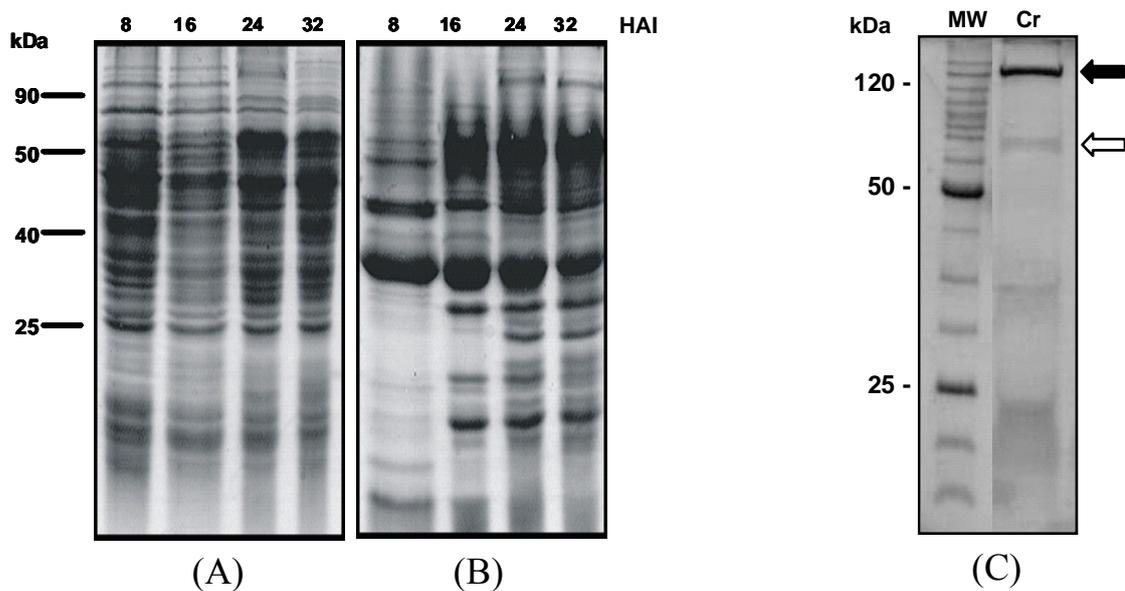


Figura 20: SDS-PAGE das proteínas da fração celular (A), da fração do sobrenadante (B) e de cristais purificados (C) de *B. thuringiensis* S811. A eletroforese foi realizada com 25 μg de cada amostra em A e B, e 10 μg em C solubilizados em 10 μL de Tampão de Amostra. Os géis foram corados com Commassie Blue-R. Em C, Cry1A, a proteína mais abundante nos cristais purificados, encontra-se marcada com uma seta preta, e Cry8H com seta branca. HAI: Horas após a inoculação; MW: Marcador de peso molecular; Cr: Cristais purificados.

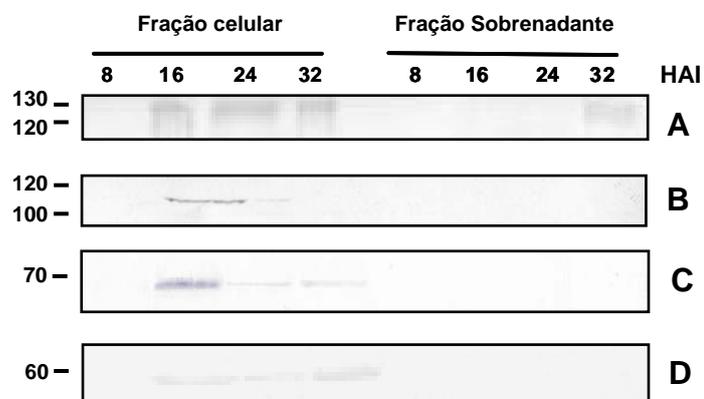


Figura 21: Western blot das frações celulares e do sobrenadante de uma cultura de *B. thuringiensis* S811. Após a transferência as membranas foram incubadas com anticorpos AntiCry1A (A), AntiVIP3 (B), AntiCry8H (C) e AntiCry1I (D). De acordo com a detecção por Western blot, todas as quatro toxinas começam a ser sintetizadas as 16 HAI e são predominantemente encontradas na fração celular. Cry1A (aprox. 130 kDa) foi detectada das 16 as 32 HAI na fração celular, e as 32 HAI na fração do sobrenadante (A). VIP3 (aprox. 110 kDa) estava presente especificamente as 16 HAI da fração celular (B). A toxina Cry8H (aprox. 70 kDa) apresentou maior abundância as 16 HAI (C), quando sua concentração diminuiu sendo então liberada no meio após as 32 HAI, podendo ser observada entre os cristais purificados (figura 20). Cry1I (aprox. 60 kDa) tem sua síntese aumentada das 16 as 32 HAI na fração celular (D).

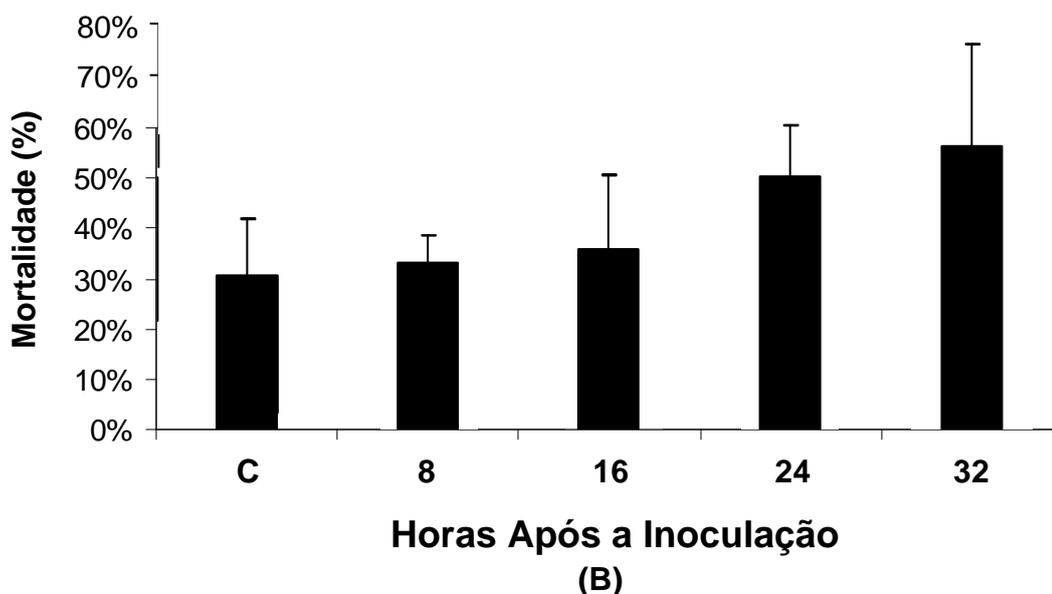
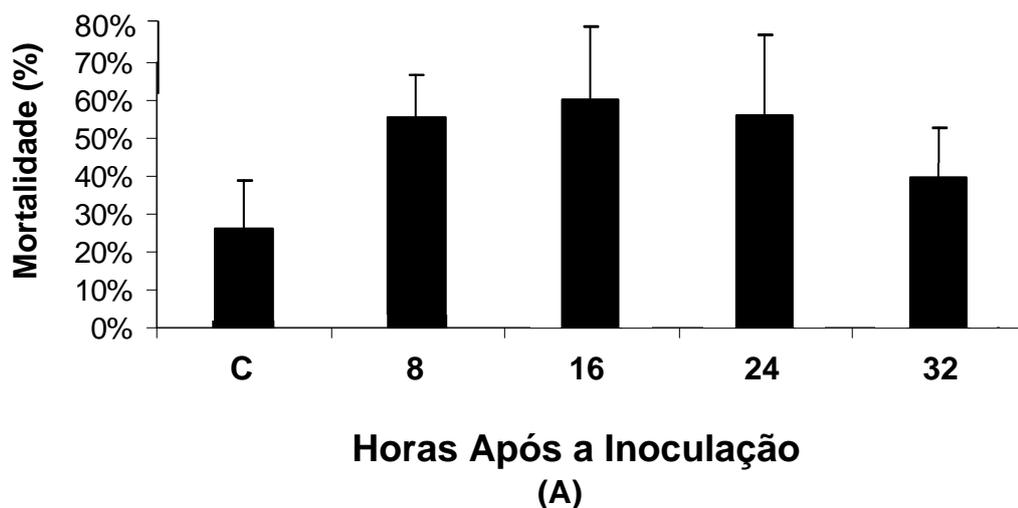


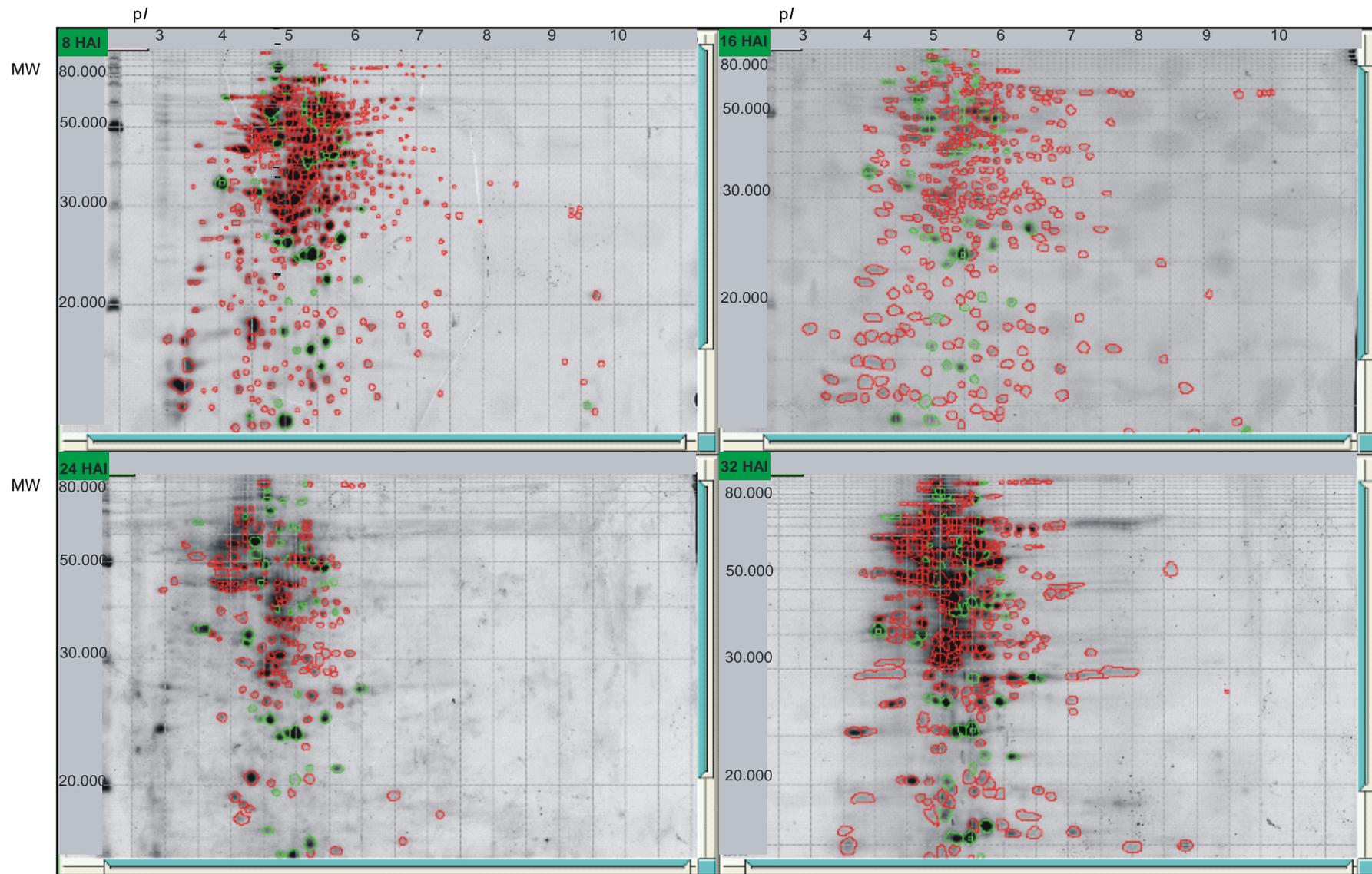
Figura 22: Atividade entomotóxica das frações celulares e do sobrenadante de uma cultura de *B. thuringiensis* S811 para larvas de *A. grandis*. Foram utilizados 500 µg de proteínas adicionadas a uma dieta artificial onde 10 larvas foram mantidas por 8 dias. Na fração celular (A), apesar de não haver diferença estatística entre as razões de mortalidade as 8, 16 e 24 HAI, uma leve alta na mortalidade (61%) foi observada as 16 HAI, onde as análises por Western blot detectaram a presença de Cry1A, Cry8H, Cry1I e VIP3A (Figura 21). Na fração do sobrenadante (B), a atividade máxima foi observada as 32 HAI, quando apenas Cry1A foi detectada (Figura 21). De acordo com o conhecimento corrente, essa classe de toxina Cry não apresenta atividade contra coleópteros, o que sugere um outro fator que possa ser responsável pela toxicidade observada nessa amostra. C: controle.

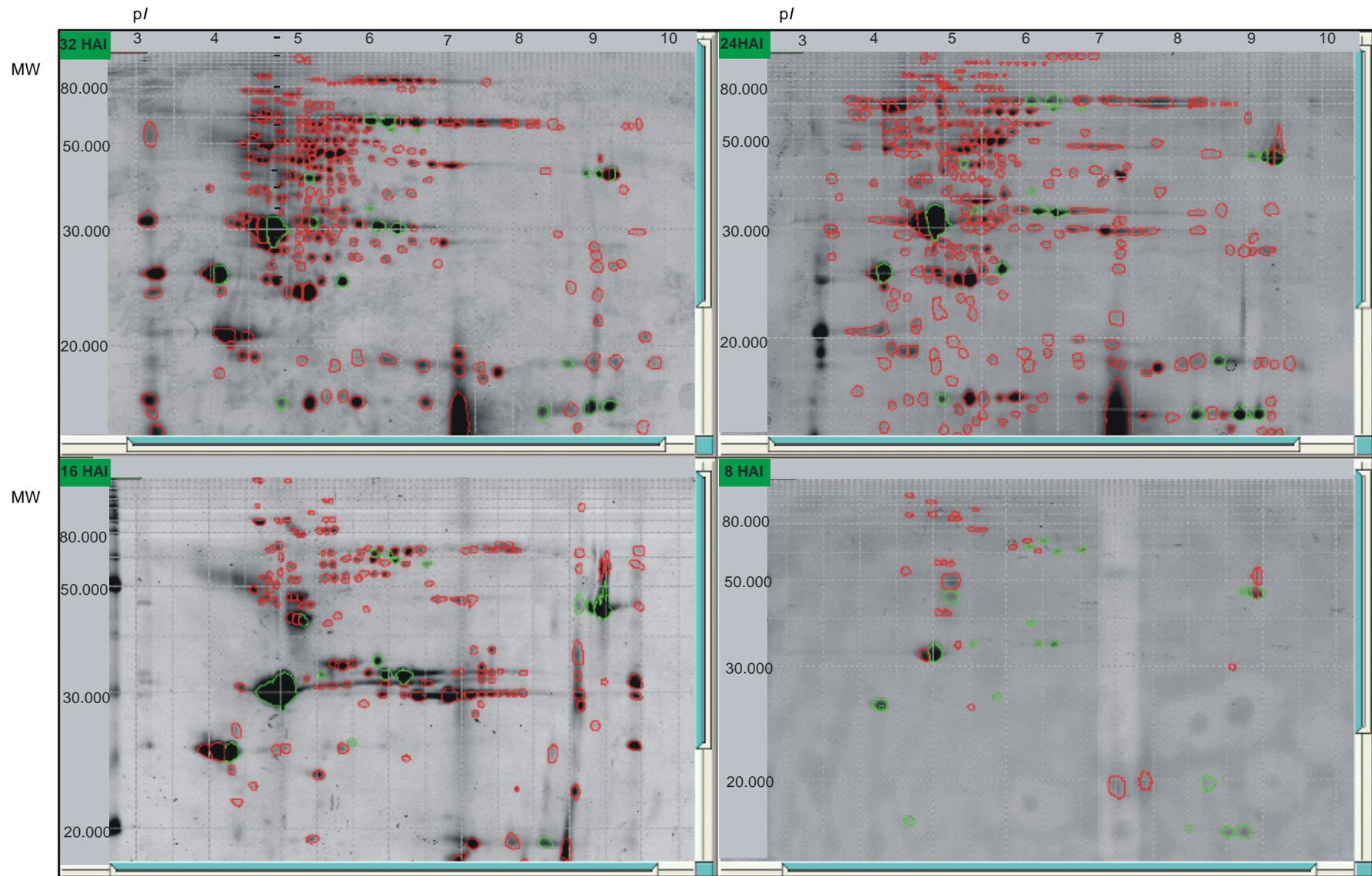
VIP3, assim como a Cry1I, são conhecidamente ativas contra coleópteros (Baum *et al.*, 2004, Sezen *et al.*, 2008). Apesar de Cry1A ser a única toxina do *Bt* S811 encontrada no estágio tóxico para *A. grandis* na fração do sobrenadante (32 HAI), é comumente sabido que essa classe de molécula não apresenta atividade contra coleópteros, o que sugere haver alguma outra molécula responsável pela atividade inseticida daquela amostra.

V.III.III. Análise proteômica do *B. thuringiensis* S811

Um estudo proteômico utilizando Eletroforese Bidimensional (2-DE) foi realizado a fim de se caracterizar a síntese e deposição de proteínas ao longo do cultivo do *Bt* S811, bem como para a identificar novas proteínas específicas para os estágios que apresentaram atividade contra *A. grandis* – estágios vegetativos da fração celular e estágios de esporulação da fração do sobrenadante. Considerando o proteoma do *Bt* S811 como um todo (Figura 23 e 24) observa-se que a maior parte das proteínas encontram-se numa faixa de massa molecular que varia de 10 à 110 kDa, com variação de ponto isoelétrico entre 4 e 7. Em torno de 412 proteínas foram detectadas em cada estágio da fração celular (Figura 23), entre elas, 55 eram constitutivas (marcadas em verde) e 107 eram específicas dos estágios vegetativos (8 e 16 HAI). Na fração do sobrenadante (Figura 24), em torno de 233 proteínas foram detectadas em cada estágio, sendo que 21 eram constitutivas (marcadas em verde) e 138 eram específicas dos estágios de esporulação (24 e 32 HAI). Foram detectadas 203 proteínas específicas das 8HAI fração celular (estágio tóxico onde nenhuma das toxinas Cry1A, Cry1I, Cry8H e VIP3A são encontradas), dentre elas uma superóxido desmutase; e 84 proteínas que tinham sua síntese aumentada naquele estágio, como uma chaperonina de 60 kDa, que teve sua síntese duplicada, e um fator de alongação, o qual teve sua síntese aumentada em 4 vezes (Figura 25) (Tabela 6). Na fração do sobrenadante foram detectadas 114 proteínas específicas das 32 HAI (estágio tóxico onde nenhuma das toxinas Cry1A, Cry1I, Cry8H e VIP3A são encontradas), dentre elas uma proteína de ligação à quitina; e 110 proteínas que tinham sua síntese aumentada naquele estágio, como uma subunidade β de ATPsintase, cuja síntese era 0,1 vez maior; uma álcool desidrogenase putativa, cuja síntese era 0,4 vezes maior; e uma proteína do invólucro do esporo, cuja síntese era 83 vezes maior (Figura 26) (Tabela 6).

A presença de uma Proteína de Ligação à Quitina às 32 HAI da fração do sobrenadante indicava uma possível relevância de atividade quitinolítica na toxicidade daquela amostra contra o *A. grandis*, visto que tais moléculas já haviam sido mostradas ativas contra insetos devido a sua ação enzimática (Chu *et al.*, 2001; Sampson *et al.*, 1998, Regev *et al.*, 1996).





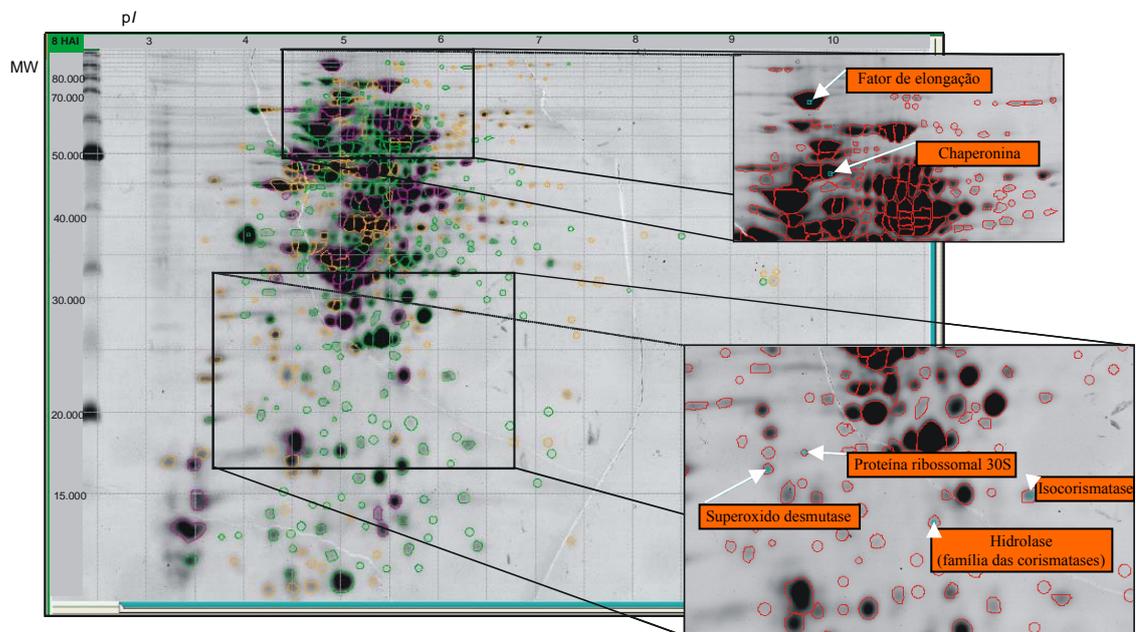


Figura 25: Proteínas da fração celular de uma cultura de *B. thuringiensis* S811, identificadas por MS, e que são sintetizadas no estágio com atividade tóxica para *A. grandis*. Foram detectadas 203 proteínas específicas das 8 HAI, marcadas em laranja. Em púrpura encontram-se 84 proteínas que têm sua síntese aumentada nesse estágio. Proteínas identificadas por espectrometria de massa encontram-se indicadas por setas. HAI: horas após a inoculação; MW: massa molecular (Da); pI: ponto isoelétrico.

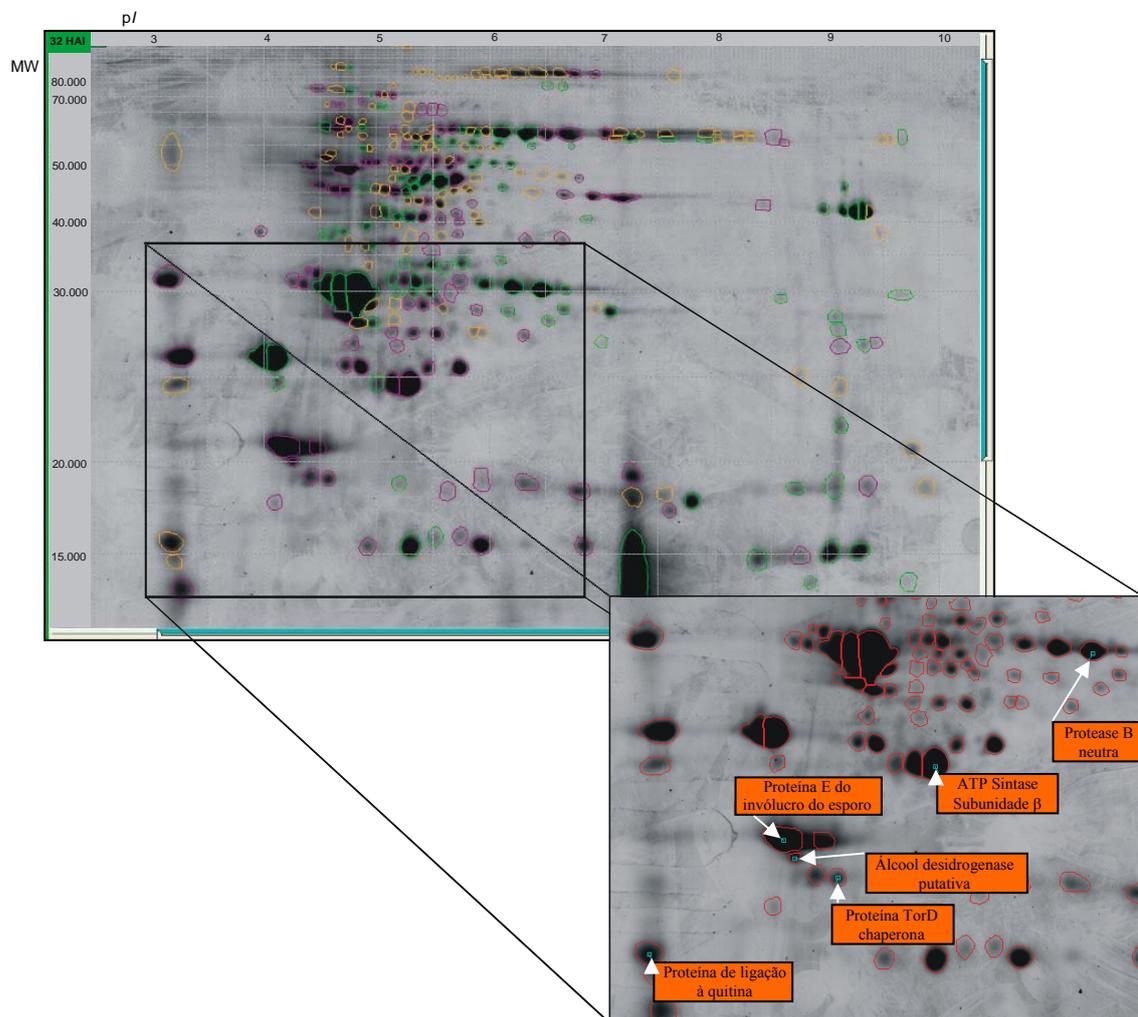


Figura 26: Proteínas da fração do sobrenadante de uma cultura de *B. thuringiensis* S811, identificadas por MS, e que são sintetizadas no estágio com atividade tóxica para *A. grandis*. Foram detectadas 114 proteínas específicas das 32 HAI, marcadas em laranja. Em púrpura encontram-se 110 proteínas que têm sua síntese aumentada nesse estágio. Proteínas identificadas por espectrometria de massa encontram-se indicadas por setas. HAI: horas após a inoculação; MW: massa molecular (Da); pI: ponto isoelétrico.

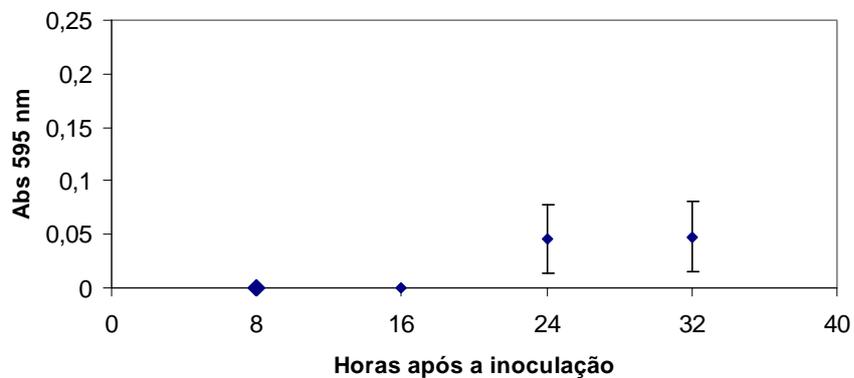
Table 6: Identificação e cinética de deposição de proteínas de uma cultura de *B. thuringiensis* S811. Um total de 12 proteínas foram identificadas por seqüenciamento de fragmentos tripticos por MS/MS ou por “*Peptide Mass Fingerprint*” (PMF). A proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua massa molecular (Mr), ponto isoelétrico (pI) e pela percentagem de volume (%Vol) com a qual elas aparecem em cada tratamento.

Proteína	Espécie	Número de Acesso	Método de identificação	Seqüência	Identidade do FT (%)	Score / Valor-e	Mr/pI no gel	Mr/pI predito	8 HAI (% Vol)	16 HAI (% Vol)	24 HAI (% Vol)	32 HAI (% Vol)	
Proteínas do sobrenadante	Chitin binding protein	<i>Bacillus cereus</i>	Q736S6	MS/MS	FGGILDQQT	100.0	40.9/0.021	21.80 / 3.30	49.85 / 6.03	-	-	-	0,92
	Putative alcohol dehydrogenase	<i>Oceanicola granulosus</i>	Q2CH29	MS/MS	GAEVTSLAIV YDDVAR	100.0	52/1e-05	29.50 / 3.75	34.64 / 5.40	-	-	0,1	0,14
	Chaperone protein torD	<i>Salmonella typhi</i>	Q8Z2M3	PMF	--	NS	142/1.6e-09	24.54 / 4.40	23.79 / 4.88	-	-	0,27	0,27
	ATP synthase subunit beta	<i>Bacillus sp.</i>	Q71CG3	MS/MS	TVLIQELINNI AQEHGGLS VFAGVGER	96.3	84.2/2e-15	38.90 / 4.80	50.21 / 5.01	-	-	2,33	2,59
	Neutral Protease B	<i>Bacillus thuringiensis</i>	YP 039061	MS/MS	ITGFGYGV GAR	100.0	39.7/0.050	29.80 / 6.50	60.9 / 5.6	2,12	1,85	0,99	1,39
	Spore Coat Protein E	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ZP 0070982	MS/MS	VNYTDEVSI GYR	100.0	42.6/0.006	20.70 / 4.20	20.7 / 4.4	-	0,03	0,47	2,62
Proteínas celulares	30S ribosomal protein S4	<i>Bacillus cereus</i>	Q817A4	MS/MS	SELPAEINEA LIVEFYSR	100.0	60.6/2e-08	25.06 / 4.75	22.98 / 9.91	0,004	0,007	-	-
	Superoxide dismutase, Mn	<i>Bacillus cereus</i>	Q730R1	MS/MS	SVEELVANL NEVPEAIR	100.0	56.2/5e-07	24.09 / 4.64	22.66 / 5.31	0,04	-	-	-
	Isochorismatase	<i>Bacillus cereus</i>	Q735J2	MSMS	NDVEGFGNL LASNLPGYQ NIIGSYR	100.0	82.5/6e-15	24.37 / 4.98	23.50 / 4.92	0,16	0,35	0,067	0,37
	60 kDa Chaperonin	<i>Bacillus anthracis</i>	Q81VE1	PMF	--	NS	97/5.4e-05	61.9 / 5.05	57.38 / 4.79	0,49	0,17	-	0,27
	Elongation Factor G	<i>Bacillus anthracis</i>	Q81VT3	PMF	--	NS	84/0.0011	88.0 / 4.91	76.51 / 4.91	2,06	0,55	0,13	0,51
	Hydrolase (isochorismatase family)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Q3EMK1	MS/MS	TFNVPTILTT VETR	100.0	47.7/2e-04	23.98 / 5.84	23.84 / 5.37	0,03	0,09	0,29	0,08

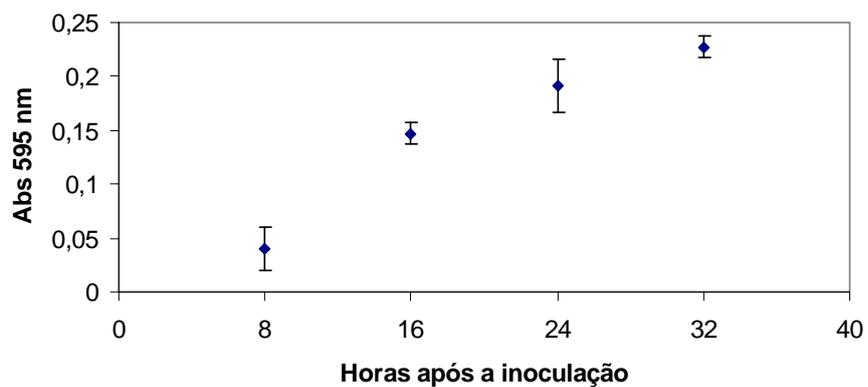
* FT: Fragmento triptico; NS: Não se aplica

Atividade quitinolítica relacionada a caráter inseticida ou aumentando a toxicidade de *Bt* contra insetos é algo bem registrado desde a década de 1970, quando foi observado que a co-aplicação de quitinases com formulações de *Bt* aumentavam a atividade inseticida (Smirnoff, 1977). Mais recentemente a atividade quitinolítica foi reportada na literatura como um fator que aumenta a toxicidade do *Bt* contra insetos (Carlini & Grossi de Sa, 2002; Brar *et al.*, 2008).

Ensaio de atividade quitinolítica realizados com ambas as frações protéicas não mostraram atividade significativa na fração celular. Contudo, na fração do sobrenadante observou-se um gradiente de atividade crescente das 8 às 32 HAI (Figura 27). Os dados mostrados aqui indicam que a toxicidade do *B. thuringiensis* S811 para *A. grandis* é em parte conferida pelas toxinas Cry8H, Cry1I e VIP3A, contudo não foi possível afirmar sobre a porcentagem de contribuição de cada dessas toxinas para o caráter inseticida da bactéria. A alta atividade quitinolítica observada na fração do sobrenadante as 32 HAI, quando apenas Cry1A foi detectada e a atividade inseticida é alta, sugere que a cepa S811 pode fazer uso de quitinases, junto às suas toxinas, para matar insetos.



(A)



(B)

Figura 27: Atividade quitinolítica na fração celular e do sobrenadante de uma cultura de *B. thuringiensis* S811. Nenhuma atividade significativa foi observada nos estágios da fração celular (A). Contudo, na fração do sobrenadante há um aumento na atividade enzimática até se alcançar um máximo as 32 HAI, quando essa fração apresenta maior atividade contra *A. grandis*.

V.IV. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Dados sobre a microbiologia e o metabolismo de proteínas de uma cultura de *Bt* S811 foram gerados. Tais dados permitiram a determinação, em horas, dos estágios vegetativos e de esporulação da cultura bacteriana, bem como apresentaram aspectos do metabolismo de proteínas durante todo o crescimento da cepa, incluindo i) teor de proteínas secretado no meio de cultura nos estágios vegetativos e de esporulação; ii) teor de proteínas nas células de uma cultura em estágio vegetativo e; iii) teor de proteínas nos esporos de *Bt* S811.

A determinação da cinética de deposição de Cry1A, Cry8H, Cry1I e VIP3A das 8 as 16 HAI nas frações celulares e do sobrenadante mostraram que essas proteínas, dentre outros momentos, encontram-se presente as 16 HAI da fração celular, exatamente quando o extrato protéico de *Bt* S811 apresenta maior atividade contra *A. grandis* naquela fração. Contudo, na fração do sobrenadante que apresentou maior atividade contra *A. grandis*, 32 HAI, apenas Cry1A foi detectada e esta classe de toxina Cry é sabidamente inativa contra coleópteros.

Dentre as 12 proteínas identificadas em uma análise proteômica por 2DE/MS do período de crescimento do *Bt* S811, uma delas, encontrada em maior abundância as 32 HAI da fração do sobrenadante, era uma proteína de ligação a quitina. Tais moléculas já foram relatadas como apresentando atividade quitinolítica. Ensaio para quantificação desse tipo de atividade enzimática foram realizados com todas as amostras protéicas e constatou-se que as 32 HAI, na fração do sobrenadante, era observada a maior atividade quitinolítica.

Os dados apresentados indicam que as toxinas Cry1I, Cry8H e VIP3A atuavam na toxicidade do *Bt* S811 contra *A. grandis* e que a possível influência de atividade quitinolítica nessa toxicidade não poderia ser descartada. Para uma melhor caracterização da ação das quitinases de *Bt* na toxicidade para *A. grandis* o gene de uma quitinase de *Bt* deveria ser clonado e a proteína recombinante deveria ser expressa e purificada para ensaios contra *A. grandis*. Sendo comprovado o potencial inseticida de quitinases de *Bt*, no futuro, uma proteína de fusão composta por uma toxina Cry e uma quitinase poderia ser construída e avaliada contra *A. grandis*.

INTERLÚDIO 1

Os dados obtidos até então mostraram que a toxicidade da cepa S811 de *Bacillus thuringiensis* para larvas do bicudo-do-algodoeiro em parte é conferida pelas toxinas Cry8H, Cry1I e VIP3A. Por um outro lado parte dessa toxicidade não poderia ser atribuída à ação de nenhuma das citadas toxinas. Essa afirmação faz-se patente quando se observa que a fração protéica do sobrenadante de uma cultura às 32 horas após a inoculação confere 58% de mortalidade para as larvas, sendo que nessa amostra nenhuma das citadas toxinas faz-se presente, a não ser a Cry1A, sabidamente inativa para coleópteros. A alta atividade quitinolítica naquela amostra sugere que, assim como diversas outras cepas de *B. thuringiensis* já relatadas na literatura, a S811 também faça uso de quitinases para matar insetos.

Neste ponto do trabalho surgiu a idéia de se utilizar quitinases de *B. thuringiensis* para incrementar a atividade inseticida da toxina Cry8H, que já vinha sendo bastante estudada no Laboratório Planta-Praga I. Tendo isso em vista foi que elaborei o projeto “Construção de uma proteína de fusão Cry8/BtChit para o controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*)”, e pelo qual fui agraciado com uma bolsa de estudos do CNPq para a execução do projeto em um estágio Sandwich na Universidade de Durham, no Reino Unido, sob a supervisão do Dr. John A. Gatehouse, pesquisador com grande notável experiência no tocante a construção de proteínas de fusão com caráter entomotóxico.

Nos meses que se seguiriam uma quitinase de *B. thuringiensis* deveria ser clonada.

VI. CAPÍTULO 2

TENTATIVA DE CONSTRUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO CRY8/BTCHIT PARA O CONTROLE DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*)

VI.I. INTRODUÇÃO AO SEGUNDO CAPÍTULO

A construção de proteínas de fusão pela união de genes que codificam para peptídeos com diferentes atividades biológicas é uma estratégia molecular já mostrada efetiva para a geração de moléculas recombinantes com elevada atividade inseticida (ver item I.III da revisão bibliográfica) (Fitches *et al.*, 2004; Trung *et al.*, 2006). No caso do *A. grandis* os dados obtidos até então indicavam que a susceptibilidade desse inseto a cepa S811 de *B. thuringiensis* era devida a algumas toxinas produzidas pela bactéria, contudo não se podia descartar a possibilidade de que quitinases de *B. thuringiensis* também contribuíssem para a toxicidade contra *A. grandis* (Capítulo 1).

Um programa para a construção de uma proteína de fusão composta por uma quitinase de *B. thuringiensis* e uma toxina Cry foi elaborado para o desenvolvimento de uma molécula recombinante potencialmente tóxica para *A. grandis*, onde o domínio quitinolítico atuaria sobre a membrana peritrófica e o domínio Cry atuaria sobre a superfície do epitélio do trato digestivo do inseto. Para tanto seria utilizada uma toxina Cry previamente clonada pelo grupo do Laboratório Planta-Praga I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia cuja atividade havia sido incrementada por técnicas de evolução molecular *in vitro*. A detecção de genes *cry* na cepa S811 de *B. thuringiensis*, incluindo o *cry8*, cuja proteína codificada é ativa para coleópteros, foi realizada seguindo-se o protocolo descrito por Bravo e colaboradores (Bravo *et al.*, 1998). Todo o processo de clonagem dos genes *cry* da cepa S811 foi descrito por Magalhães (Magalhães *et al.*, em preparação). Posteriormente o gene para *cry8* foi clonado no vetor pComb3XSS para a construção de uma biblioteca combinatória por DNA Shuffling. Os variantes obtidos foram então selecionados por Phage Display e as colônias selecionadas foram utilizadas para inoculação e expressão no sistema fago HELPER VCSM13. A atividade tóxica das proteínas sintetizadas a partir dos genes mutantes foi avaliada em bioensaios com *A. grandis*, sendo que o mutante BI-25 foi o que apresentou maior taxa de letalidade. Todos os procedimentos de construção da biblioteca combinatória, seleção de variantes e ensaios de atividade com as proteínas mutantes, encontram-se descritos em (Oliveira, 2008). A sequência do mutante BI-25 foi re-sintetizada com alteração de códons para otimização da expressão em eucariotos e clonada no vetor pBSK (Stratagene), sendo esse gene mutante o selecionado para experimento de construção de uma proteína de fusão composta por uma toxina *Bt* e uma quitinase.

Para o correto andamento do projeto, uma estratégia de clonagem de um gene de quitinase de *B. thuringiensis* foi elaborado a partir da sequência de um gene de *B. thuringiensis*

serovar Sotto que codifica para uma quitinase de 75 kDa com 4 domínios, sendo eles um peptídeo sinal de 42 kDa, um domínio catalítico N-Terminal, um domínio do tipo fibronectina do tipo III, e um domínio de ligação a quitina C-Terminal (Zhong *et al.*, 2005). O gene em questão mostrou-se altamente conservado em dois outros serovares de *B. thuringiensis*, sendo por isso selecionado para o procedimento de clonagem

Após dois meses trabalhando no processo de clonagem, nenhuma amplificação do gene foi alcançada. Visando cumprir com o cronograma foi decidido pela substituição da quitinase de *B. thuringiensis* por uma outra de café, cujo gene havia sido previamente clonado pelo grupo da Dra. Ângela Mehta a partir da seqüência encontrada no Contig 14550 do Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) anotado como uma quitinase de classe III. Tal gene, segundo os dados do Projeto Genoma Café, é altamente expresso em tecidos de café submetidos a estresse biótico. O gene da quitinase de café, então denominado *caciichit* (*Coffea arabica* Class III Chitinase), foi primeiramente subclonado em um vetor para expressão heteróloga em *Pichia pastoris* para que a proteína recombinante purificada tivesse sua atividade inseticida avaliada. Apenas se comprovada a atividade inseticida os passos seguintes para a construção da proteína de fusão Chit/Cry seriam dados.

VI.II. METODOLOGIA

VI.II.I. Tentativa de clonagem de uma quitinase de *Bacillus thuringiensis*

Extração de DNA genômico de B. thuringiensis. Uma colônia de *B. thuringiensis* S811 foi utilizada para inocular 10 mL de meio Caldo Nutritivo. A cultura foi mantida durante a noite a 28 °C sob agitação de 275 rpm até atingir uma O.D. ₆₀₀ de 2.0-2.5. Deste pré-inóculo 250 µL foram utilizados para inocular 5 mL de meio Caldo Nutritivo que foi mantido sob as mesmas condições do pré-inóculo por 8 horas, quando então as células foram precipitadas por centrifugação a 13.000 g por 5 minutos, lavadas com 0,7 mL de água destilada e resuspensas em 0,7 mL de tampão Tris/EDTA (T.E.) (Apêndice 1). Às células foram adicionados 50 µL de uma solução de lisozima (28 mg/mL) seguida de incubação por 1 hora à 37 °C. Foram adicionados 168 µL de (Na₂)EDTA 5 mM pH 8.0 e 18 µL de uma solução de tripsina 10 mg/mL e a incubação continuou por mais 5 minutos. Adicionou-se 98 µL de SDS 10%, agitou-se os tubos suavemente e o material retornou para a incubação por mais 2 horas. A amostra foi precipitada com 2 volumes de etanol absoluto gelado e centrifugada a 11.600 g por 5 minutos. O precipitado foi resuspenso em 350 µL de tampão T.E., ao que foi adicionado 10 µL de uma solução de RNase (3,5 µg/mL) seguida de incubação à 37 °C por 30 minutos. O material foi precipitado com 360 µL de fenol:clorofórmio (1:1), seguido de agitação lenta e repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase superior foi coletada e a precipitação com fenol:clorofórmio foi repetida. O DNA cromossomal foi precipitado da camada superior adicionando-se acetato de sódio 3 M na proporção 1:10 (v/v) e 0.7 mL de etanol gelado. Seguiu-se agitação lenta e precipitação a -20 °C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. A lavagem foi repetida e o material secado a vácuo.

Reações de PCR para a amplificação do gene de quitinase de B. thuringiensis. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1,5 µg de DNA molde, 2 unidades de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), MgSO₄ 50 mM, dNTPs 10 mM e 0,4 µM dos oligonucleotídeos iniciadores *BtChitfor* (5'ATGCCTTTAAATATATCTTTTATTTTGAAAGG3') e *BtchitRev* (5'CTAGTTTT CGCTAATGACGGC3'). As condições das reações foram: 94 °C por 1 min; 30 ciclos de 45s a 94 °C, 45s a (48, 50, 52, 54 e 56 °C), 1 min a 72 °C e uma extensão final de 5 min a 72 °C. O resultado da reação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

VI.II.II. Clonagem do gene de uma quitinase de classe III de café (*Coffea arabica*) (*caciiichit*) para expressão em *Pichia Pastoris*

Plantas de café *C. arabica* foram cultivadas em casa de vegetação por aproximadamente 6 meses. As folhas foram utilizadas para a extração de RNA pelo método do Trizol (Invitrogen) e os cDNAs foram sintetizados utilizando-se o Kit First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). O cDNA contendo a seqüência completa de *caciiichit* foi amplificado utilizando-se *primers* desenhados de acordo com a seqüência encontrada no contig 14550 do Genoma do Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>), (Figura 28) anotado como uma quitinase de classe III: pFwd 5'ATGGCTCCCTGTTTTAGA3'; pRev 5'TTACTCATCCACAAAAGA3'. As condições de PCR foram: 5 min a 95 °C; 45 s a 95 °C; 45 s a 60 °C; 1 min a 72 °C (40 ciclos) e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Um fragmento de 970 bp foi amplificado, clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante, e posteriormente seqüenciado para confirmação da clonagem.

VI.II.III. Subclonagem de *caciiichit* em um vetor para expressão em *Pichia pastoris*

O vetor pGEM T-Easy carregando o gene *caciiichit* (*Coffea arabica* class III Chitinase) foi usado como molde para a subclonagem de *caciiichit* no vetor pGAPZα-B (Invitrogen) para expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. A região compreendendo o peptídeo sinal foi delimitada pelo software SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e *primers* foram desenhados para subclonar a seqüência codificadora de região madura da proteína: *caciiichitfwd* 5'TAAGAATTCAAGCTGGAATTGCCACCTAC3'; *caciiichitrev* 5'TTAGTCGACCTCATCCACAAAAGACTTTATCATG3'. Sítios para as enzimas de restrição *EcoR* I e *Sal* I foram inseridos nas extremidades 5' e 3' dos *primers forward* e *reverse* respectivamente, sendo mostrados acima sublinhados. Um códon para Glutamina foi inserido no final do sítio de restrição para *EcoR* I (mostrado em itálico no *primer forward*) a fim de se manter o gene na pauta de leitura correta. A escolha de Glutamina foi feita tentando-se manter da forma mais coerente possível as propriedades físico-químicas do primeiro aminoácido natural. As condições de PCR para a amplificação de *caciiichit* foram: 30 s a 98 °C; 10 s a 98 °C; 10 s a 60 °C; 45 s a 72 °C (20 ciclos) e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Ao final da reação 10 µL do material amplificado (20% do total) foram analisados em gel de agarose 0,8%. Como esperado, um fragmento de 890 bp foi amplificado (Figura 29). O restante do material da amplificação (40 µL) foi purificado com o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (50) (Quiagen)

CCCACGCGTCCGAAAAATACACACGAAAGCAAGCCTGCAAAAACAACCGAGAGGAGAAAA
 A **ATGGCTCCCTGTTTTAGAG**CACTAGTCATAGCAATAACATCGCTGTTGATGATATCTTC
 AGTGATCAGGTCTTCCGATGCT**GCTGGAATTGCCACCTACT**TGGGGCCAAAACACTGACGA
 AGGAAGCCTGGAAGACGCATGCCGGAGAGGTACCTATGACTACGTGAATCTTGCCTTTCT
 GATAAATTATGGCAATGGCCAGACACCAGAATTGAACTTAGCTGGGCATTGTGAGCGAAG
 CGCTTGCTCCTCGCTTAGTTCTGAGATAAAAGCTTGCCAGAAAACGAGGCATCCAAGTGCT
 TCTTTCTCTCGGTGGAGCTCCAAACCTTTCTTCACGCGATGATGCTAAGGAAGTCGCGTC
 CTATCTCTATAATAATTTCTTGGCGGTGAATCACAATAACGTCATTAGGCGATGCTGT
 CTTAGACGGTATAGACTTTTCATATCCAAGGTGGAAGTAGGGATTTCTTGGATGATCTCGC
 CAAGGCGCTCTCAGAATATAGAACAACAGAGAGAAGGGTGCACCTTATCTGCAGCACCACA
 ATGTTTCTATCCTGACTATTATCTTGACGCTGCCATCAGAAGTGGCCTCTTTGATTATGT
 GTGGGTGCAATTTTACAACAATCCGCCTTGTGAGTATAGTATGGGCAATGCCAACAACT
 CATCAACAGTTGGAGCTCTCATTGGGCTTACATCCAGGAGTTAACAACTATTCTGGG
 ATTACCTGCATCCCCTGAAGCCGCTCCTTCTGGCGGTTACATTCCACATCGGATTCTTAT
 TCGTGAAGTTCTTCCCCAAATCCAGGACTATCCCACTATGGAGGCGTCATGCTTTGGAA
 CGTATACTATGACGAGAATTATAGTCAGGCAATCAGGCCTTATGTTAACCTGAACTCT
 GACTTTTGATCGCAGGTCCACGATTAAGTACCCAAGAAAGTCCATGATAAAG**TCTTTTGT**
GGATGAGTAAGTTTCTCTCATTATCTTATGAGAGATGAAATAAGTATAATATAATCCCGG
 TGGTTTGAGCCAGAGATAATGTTAATAAATAAGTTCCTCTCATTATCTGTGAGAGATGA
 AATGTAATCCGGGTTGCTTTTGAAGAGATAAATTGAATAAATAAATAAATCAATGGGTTT
 TCAATCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAAAAAAAAAATGGGGATGATAAGGGA
 ACACCTCACGACGTGCCCTTCTTCTTGATGCACGGAAGAGTAGGGCTCACGGTTATGCC
 CTCATGTGGGACAATCATAACAGTAAGTGGGGTTCGCACTACTCTGGATCAGCTGAGGAT
 CAATGACTTTAATTATATATACTGTTTATGGTGTGGCCTTCAGTTT

Figura 28: Sequência de bases do contig 14550 do Genoma Café. A Pauta Aberta de Leitura (*Open Read Frame – ORF*), delimitada pelo códon de iniciação ATG (grifado em verde) e pelo códon de parada TAA (grifado em vermelho), contém 969 bases, sendo que as primeiras 81 (sublinhadas) codificam para o peptídeo sinal da proteína. As bases em verde, dentro da região codificadora do peptídeo sinal, incluindo o códon de iniciação foram as utilizadas para a construção do *primer forward* para a clonagem do gene completo, enquanto as vermelhas, incluindo o códon de parada, foram as utilizadas para a construção do *primer reverse*. As bases em verdes logo após o término da região codificadora do peptídeo sinal foram as utilizadas na construção do *primer forward* para a clonagem da região codificadora da proteína madura.

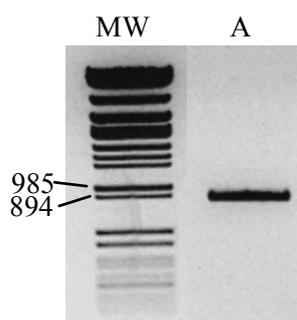


Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 0,8 % para a visualização da amplificação da região de *caciichit* codificadora da proteína. Um fragmento de 890 bp foi amplificado. A 10 μ L da reação de PCR foram adicionados 3 μ L de Tampão de Amostra (Fermentas) e o volume final foi aplicado no gel.

(Apêndice 3), e digerido com *EcoR* I e *Sal* I (inserto purificado 30 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ 43 μL , Tampão Fermentas O 10x 5 μL , *Sal* I (12 $\text{u}/\mu\text{L}$) 1 μL , *EcoR* I (12 $\text{u}/\mu\text{L}$) 1 μL , H_2O estéril 1 μL , mantida a 37 °C durante a noite), para a geração de extremidades coesivas. Em seguida o inserto digerido foi novamente purificado e utilizado numa reação de ligação (plasmídeo pGAPZ α -B 23 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ 4,5 μL , inserto purificado 19,5 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ 4 μL , T4 Tampão DNA Ligase 10x 1 μL , T4 DNA Ligase 1 $\text{u}/\mu\text{L}$ 0,5 μL , mantida a temperatura ambiente por 30 min) para a inserção do fragmento amplificado no vetor pGAPZ α -B previamente digerido com *EcoR* I e *Sal* I (Plasmídeo pGAPZ α -B 70 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ 15 μL , *Sal* I (12 $\text{u}/\mu\text{L}$) 0,5 μL , *EcoR* I (12 $\text{u}/\mu\text{L}$) 0,5 μL , Tampão Fermentas O 10x 3 μL , H_2O estéril 11 μL , mantida a 37 °C durante a noite após o que o vetor digerido foi purificado).

Da reação de ligação, 0,7 μL foram utilizados para transformar células de *E. coli* Top 10 eletrocompetentes (Apêndice 3). As células transformadas foram plaqueadas em Meio de Seleção LS-LB Zeocina 0,05 mg/mL (Apêndice 2) e mantidas a 37 °C durante a noite. Das colônias que emergiram, três foram selecionadas para os procedimentos de extração do DNA plasmidial utilizando-se o Kit Wizard Plus. SV Minipreps; DNA Purification System – Promega (Apêndice 3) para a confirmação da subclonagem.

VI.II.IV. Transformação de *Pichia pastoris* com pGAPZ α -B/*caciiichit* e ensaios de expressão em pequena escala

Em torno de 10 μg de pGAPZ α -B/*caciiichit* foram utilizados para transformar, por choque térmico, células competentes de *P. pastoris* SMD1168 deficientes em proteases. O plasmídeo carregando o gene *caciiichit* foi linearizado com a enzima de restrição *Bln* I (pGAPZ α -B/*caciiichit* 155 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ 71,5 μL , Tampão *Bln* 10x 8 μL , H_2O estéril 0,5 μL) e a transformação foi realizada de acordo com o protocolo do *Pichia* EasyComp™ Transformation (Invitrogen) (Apêndice 3). As células transformadas foram plaqueadas em meio YPG/Zeoocina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Agar 1,5% (Apêndice 2) e mantidas a 28 °C até o surgimento das primeiras colônias (2 a 4 dias). As colônias transformadas foram utilizadas em ensaios de expressão em pequena escala onde cada colônia foi utilizada para inocular 10 mL de meio YPG/Zeoocine 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ líquido. As culturas foram mantidas a 28 °C sob agitação de 220 rpm por 4 dias, após o que as células foram precipitadas por centrifugação (4.000 g por 10 min a temperatura ambiente) e os sobrenadantes analisados por SDS-PAGE e Western blot.

VI.II.V. PCR de colônia para confirmação de integração de *caciiichit*

Células de *Pichia pastoris* transformadas com pGAPZ α -B/*caciiichit* foram lisadas por choque térmico em 5 μ L de água estéril (1 min em nitrogênio líquido seguido de 1 min em água fervente. Procedimento repetido 5x) e centrifugado a 10.000 g por 5 min a temperatura ambiente. Subsequentemente 1 μ L do sobrenadante foi utilizado como molde em reações de PCR com os *primers* do vetor (pGAP forward e 3'AOX reverse, que amplificam o gene de interesse mais um fragmento de 540 bp) para amplificação da região de *caciiichit* codificadora da proteína madura. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 μ L contendo 1,5 μ g de DNA molde, 2 unidades de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), MgSO₄ 50 mM, dNTPs 10 mM e 0,5 μ g dos oligonucleotídeos iniciadores pGAP forward e 3'AOX. As condições das reações foram: 94 °C por 2 min; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C e uma extensão final de 7 min a 72 °C. O resultado da reação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

VI.II.VI. SDS-PAGE e Western blot para a detecção da expressão de *caciiichit* recombinante

Para a detecção de CacIIChit recombinante 24 μ L de cada sobrenadante foram adicionados a 6 μ L de Tampão de Amostra (Apêndice 3) e resolvidos por SDS-PAGE (4% gel de aplicação / 12,5% gel principal e Tampão de Corrida Tris/Glicina (Laemmli, 1970), sendo as condições elétricas de 12 mA enquanto a amostra percorria o gel de aplicação e 15 mA durante a corrida pelo gel principal e o tempo de corrida de 30 – 40 min). Para cada ensaio foram realizadas duas eletroforeses, uma delas para coloração com Commassie Blue-R e outra para os procedimentos de eletrotransferência. No caso dessa última, após a eletroforese os géis eram incubados por 10 min em Tampão de Transferência (Apêndice 1) sob agitação suave. Para as análises por Western blot (Towbin *et al.*, 1979) foram utilizadas membranas de nitrocelulose Hybond-C (G.E. Healthcare). Os procedimentos de eletrotransferência foram realizados em um sistema semi-seco Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) com 0.05 V/gel durante uma hora. Após a transferência as membranas foram incubadas em 10 mL de Solução de Bloqueadora composta por Tampão PBS (Apêndice 1) contendo 5 % m/v de leite desnatado por 45 min sob agitação suave. Depois do bloqueio as membranas foram incubadas por 45 min em 10 mL de Solução Bloqueadora contendo o primeiro anticorpo Anti-Histag na proporção de 1:3.000 v/v por 40 min sob agitação suave, seguida de incubação em 40 mL de solução Bloqueadora contendo o segundo anticorpo conjugado a HRP na proporção de 1:3.000 v/v.

Entre as incubações e antes do desenvolvimento da reação as membranas foram lavadas 5 vezes com Solução Bloqueadora contendo Tween-20 0,1%. As reações foram desenvolvidas em 5 mL do substrato para HRP (Apêndice 1).

VI.II.VII. Expressão de *caciiichit* em larga escala (fermentação)

Uma colônia positiva e que, segundo os dados obtidos por SDS-PAGE, expressava *caciiichit* em grande quantidade, foi selecionada para a expressão de *caciiichit* em fermentador de 3 litros BioFlo 110 (New Brunswick Scientific) de acordo com o protocolo descrito por Fitches e colegas (Fitches *et al.*, 2004a). Para tanto a colônia selecionada foi utilizada para inocular 300 mL de Meio YPG/Zeocina 0,05 mg/mL, que foi mantido a 28 °C sob agitação de 220 rpm por 3 dias, quando então a cultura foi utilizada para inocular os 3 litros do Meio de Fermentação (Apêndice 2). A fermentação aconteceu durante 4 dias a 30 °C, com 30% de oxigênio dissolvido, pH 5.0 e agitação contínua. A cultura era alimentada com glicerol numa razão de 7,5 mL/h.

VI.II.VIII. Purificação de *CacIIIChit*

Ao final da fermentação as células foram precipitadas por centrifugação a 13.000 g por 25 min a 4 °C. O sobrenadante da fermentação foi filtrado em 0,2 µm e diluído em acetato de sódio pH 4.0 para uma concentração de 50 mM. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de troca iônica em uma coluna de 25 mL contendo matriz S-Sepharose (G.E. Healthcare) previamente equilibrada com acetato de sódio 50 mM pH 4.0 com fluxo de 2 mL/min. As proteínas retidas foram eluídas com um gradiente de NaCl de 0 à 1 M e avaliadas por SDS-PAGE em gel 12,5% (para detalhes sobre os procedimentos de eletroforese ver “*SDS-PAGE e Western blot para a detecção de *CacIIIChit* recombinante*”). Cinco mililitros do material purificado foram dialisados contra Tampão Fosfato de Sódio 80 mM pH 6.8 e utilizados em ensaios de atividade quitinolítica. O restante foi dialisado contra Bicarbonato de Amônio e liofilizado.

VI.II.IX. Ensaio de atividade enzimática de *CacIIIChit*

Para a avaliação da atividade enzimática da proteína recombinante purificada, três amostras foram dializadas contra Tampão Fosfato de Sódio 80 mM pH 6.8, sendo elas: o sobrenadante de uma cultura inoculada leveduras transformadas com pGAPZ α -B vazio, o sobrenadante de uma cultura inoculada com leveduras transformadas com pGAPZ α -

B/*caciii*chit, e CacIIIChit purificada. À 300 μ L de todas as amostras, contendo 5 μ g de proteínas, foram adicionados 200 μ L do substrato colorimétrico CM-chitin-RBV (1 mg/mL) o ensaio foi realizado como descrito por Fitches (Fitches *et al.*, 2004b). As reações foram mantidas à 37 °C por 2 horas sendo agitadas a cada 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de HCl 1 N e as amostras foram deixada sobre a bancada por 15 min seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi lida a 550 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e repetido em pH 4.8, 5.8, 7.8, 8.8.

VI.III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.III.I. Tentativa de Clonagem de uma quitinase de *B. thuringiensis*

Para a clonagem de uma quitinase de *B. thuringiensis* foi realizado um alinhamento com seqüências de genes de quitinase de três sorotipos de *B. thuringiensis*, sendo eles: Kurstaki (número de acesso: AJ635226), Sotto (número de acesso: AY129671) e Israelensis (número de acesso: AF526379). Como grupo externo, foi utilizado a seqüência de uma quitinase de *Bacillus cereus* (número de acesso: AB041932) (Figura 30). O alinhamento, realizado com o software Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), mostrou que o gene em questão encontra-se altamente conservado nos três sorotipos de *B. thuringiensis*, sendo assim, foram desenhados *primers* específicos para a amplificação a partir das extremidades 5' e 3' e clonagem no vetor pGEM-T Easy. A extensão dos *primers* foi determinada de acordo com a estabilidade em reações de PCR com parâmetros pré-determinados pelo software Oligotech.

Um protocolo para extração de DNA genômico de *B. thuringiensis* foi estabelecido pela modificação do método descrito por Bizzarri e colaboradores (Bizzarri *et al.*, 2007). O DNA genômico foi utilizado como molde nas reações de PCR onde as seguintes temperaturas de anelamento foram utilizadas: 48, 50, 52, 54 e 56 °C. Em nenhuma das reações foi observada amplificação do gene. Além das variações nas temperaturas de anelamento foram também testadas variações na concentração do DNA molde (2x), *Taq* Polymerase (4x) e oligonucleotídeos iniciadores (0,25x), ainda assim nenhuma amplificação foi observada.

Com o intuito de cumprir com o cronograma estabelecido para o projeto “Construção de uma proteína de fusão Cry8/BtChit para o controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*)” foi decidido pela utilização de um gene de quitinase do café (*Coffea arabica*) previamente clonado pelo grupo da Dra. Ângela Mehta, colaboradora do Laboratório Planta-Praga I.

VI.III.II. Subclonagem de *caciichit* em um vetor para expressão em *P. pastoris*

De acordo com a seqüência encontrada no contig 14550 do Genoma Café, anotado como uma quitinase de classe III, *primers* foram desenhados para a clonagem do gene completo a partir de folhas de café, bem como para a subclonagem da região codificadora da proteína madura no vetor pGAPZ α -B para a expressão heteróloga constitutiva em *P. pastoris*.

```

Bt kurstaki      ATGCCTTTAA ATATATCTTT TATTTTGAAA GGAGAAATGG CTATGAGGTC TCAAAAATTC ACACCTGCTAT
Bt sotto        ATGCCTTTAA ATATATCTTT TATTTTGAAA GGAGAAATGG CTATGAGGTC TCAAAAATTC ACACCTGCTAT
Bt israelensis ATGCCTTTAA ATATATCTTT TATTTTGAAA GGAGAAATGG CTATGAGGTC TCAAAAATTC ACACCTGCTAT
B cereus        ATGC TTTAA ATATATCTTT TATTTTGAAA GGAGAAATGG CTATGAGGTC TCAAAAATTC ACACCTGCTAT
Clustal Consensus
*****
80          90          100         110         120         130         140
Bt kurstaki      TACTATCCTC ACTACTTTTC TTACCTCTTT TTCTCACAAA TTTTATTACT CCAAACTCGC CATTAGCAGA
Bt sotto        TACTATCCTC ACTACTTTTC TTACCTCTTT TTCTCACAAA TTTTATTACT CCAAACTCGC CATTAGCAGA
Bt israelensis  TACTATCCTC ACTACTTTTC TTACCTCTTT TTCTCACAAA TTTTATTACT CCAAACTCGC CATTAGCAGA
B cereus        TACTATCCTC ACTACTTTTC TTACCTCTTT TTCTCACAAA TTTTATTACT CCAAACTCGC CATTAGCAGA
Clustal Consensus
*****
150          160          170         180         190         200         210
Bt kurstaki      TTCACCAAGC CAAAGTCAAA AAATGTTGG GTACTTTTCT TCGTGGGGCG TTTACGGACG TAATTATCAA
Bt sotto        TTCACCAAGC CAAAGTCAAA AAATGTTGG GTACTTTTCT TCGTGGGGCG TTTACGGACG TAATTATCAA
Bt israelensis  TTCACCAAGC CAAAGTCAAA AAATGTTGG GTACTTTTCT TCGTGGGGCG TTTACGGACG TAATTATCAA
B cereus        TTCACCAAGC CAAAGTCAAA AAATGTTGG ATACTTTTCT TCGTGGGGCG TTTACGGACG TAATTATCAA
Clustal Consensus
*****
220          230          240         250         260         270         280
Bt kurstaki      GTTGTGACA TTGATGCATC AAAACTTACT CACCTTAAC TATGCTTCGC GGATATTTGT TGGAAATGGAA
Bt sotto        GTTGTGACA TTGATGCATC AAAACTTACT CACCTTAAC TATGCTTCGC GGATATTTGT TGGAAATGGAA
Bt israelensis  GTTGTGACA TTGATGCATC AAAACTTACT CACCTTAAC TATGCTTCGC GGATATTTGT TGGAAATGGAA
B cereus        GTTGTGACA TTGATGCATC AAAACTTACT CACCTTAAC TATGCTTCGC GGATATTTGT TGGAAATGGAA
Clustal Consensus
*****
290          300          310         320         330         340         350
Bt kurstaki      AACATGGAAA CCGTCTACT CATCTGATA ATCCAAATA ACAACGTGG AACGTAAAG AATCTGGTGT
Bt sotto        AACATGGAAA CCGTCTACT CATCTGATA ATCCAAATA ACAACGTGG AACGTAAAG AATCTGGTGT
Bt israelensis  AACATGGAAA CCGTCTACT CATCTGATA ATCCAAATA ACAACGTGG AACGTAAAG AATCTGGTGT
B cereus        AACATGGAAA CCGTCTACT CATCTGATA ATCCAAATA ACAACGTGG AACGTAAAG AATCTGGTGT
Clustal Consensus
*****
360          370          380         390         400         410         420
Bt kurstaki      ACCATTCGAA AATAAAGAGG TTCCCTAATG TACTCTCGTA CTCGG GGAC CATGGGCTGA TGTACCAAA
Bt sotto        ACCATTCGAA AATAAAGAGG TTCCCTAATG TACTCTCGTA CTCGGTGAAC CATGGGCTGA TGTACCAAA
Bt israelensis  ACCATTCGAA AATAAAGAGG TTCCCTAATG TACTCTCGTA CTCGGTGAAC CATGGGCTGA TGTACCAAA
B cereus        ACCATTCGAA AATAAAGAGG TTCCCTAATG TACTCTCGTA CTCGGTGAAC CATGGGCTGA TGTACCAAA
Clustal Consensus
*****
430          440          450         460         470         480         490
Bt kurstaki      TCGTATCCT GGCTCAGGGA CAACTGGGA AGATTGCGAT AAATATGCC GTTCCGGAAA TTTCCGGGAA
Bt sotto        TCG TATCCT GGCTCAGGGA CAACTGGGA AGATTGCGAT AAATATGCC GTTCCGGAAA TTTCCGGGAA
Bt israelensis  TCG TATCCT GGCTCAGGGA CAACTGGGA AGATTGCGAT AAATATGCC GTTCCGGAAA TTTCCGGGAA
B cereus        TCG TATCCT GGCTCAGGGA CAACTGGGA AGATTGCGAT AAATATGCC GTTCCGGAAA TTTCCGGGAA
Clustal Consensus
*****
500          510          520         530         540         550         560
Bt kurstaki      CTAAAACGAT TAAAAGCTAA ATATCCTCAC TFAAAAACA TTATTTCCGT TGGTGGCTGG ACTTGGTCTA
Bt sotto        CTAAAACGAT TAAAAGCTAA ATATCCTCAC TFAAAAACA TTATTTCCGT TGGTGGCTGG ACTTGGTCTA
Bt israelensis  CTAAAACGAT TAAAAGCTAA ATATCCTCAT TFAAAAACA TTATTTCCGT TGGTGGCTGG ACTTGGTCTA
B cereus        CTAAAACGAT TAAAAGCTAA ATATCCTCAC TFAAAAACA TTATTTCCGT TGGTGGCTGG ACTTGGTCTA
Clustal Consensus
*****
570          580          590         600         610         620         630
Bt kurstaki      ACCGTTTTTC TGATATGGCC GCTGATGAAA AAACAAGAAA AGTATTGGT GAATCTACAG TAGCTTTTCT
Bt sotto        ACCGTTTTTC TGATATGGCC GCTGATGAAA AAACAAGAAA AGTATTGGT GAATCTACAG TAGCTTTTCT
Bt israelensis  ACCGTTTTTC TGATATGGCC GCTGATGAAA AGACAAGAAA AGTATTGGT GAATCTACAG TAGCTTTTCT
B cereus        ACCGTTTTTC TGATATGGCC GCTGATGAAA AAACAAGAAA AGTATTGGT GAATCTACAG TAGCTTTTCT
Clustal Consensus
*****
640          650          660         670         680         690         700
Bt kurstaki      TCGGCATAT GGGTTTGATG GCGTAGATT AGACTGGGAA TATCCGGGCG TTGAAACGAT TCCTGGTGT
Bt sotto        TCGGCATAT GGGTTTGATG GCGTAGATT AGACTGGGAA TATCCGGGCG TTGAAACGAT TCCTGGTGT
Bt israelensis  TCGGCATAT GGGTTTGATG GCGTAGATT AGACTGGGAA TATCCGGGCG TTGAAACGAT TCCTGGTGT
B cereus        TCGGCATAT GGGTTTGATG GCGTAGATT AGACTGGGAA TATCCGGGCG TTGAAACGAT TCCTGGTGT
Clustal Consensus
*****
710          720          730         740         750         760         770
Bt kurstaki      AGTTATCGTC CTGAAGATA ACAAAATTTT ACTCTCCTTC TTCAAGAGCT CCGAAATGCT TTGAATAAAG
Bt sotto        AGTTATCGTC CTGAAGATA ACAAAATTTT ACTCTCCTTC TTCAAGAGCT CCGAAATGCT TTGAATAAAG
Bt israelensis  AGTTATCGTC CTGAAGATA ACAAAATTTT ACTCTCCTTC TTCAAGAGCT CCGAAATGCT TTGAATAAAG
B cereus        AGTTATCGTC CTGAAGATA ACAAAATTTT ACTCTCCTTC TTCAAGAGCT CCGAAATGCT TTGAATAAAG
Clustal Consensus
*****
780          790          800         810         820         830         840
Bt kurstaki      CAGGTGCTGA AGATGGCAA CAATATTTAC TAACAATGCG TTCAGGTGCA AGCCAACGCT ACGCTGATCA
Bt sotto        CAGGTGCTGA AGATGGCAA CAATATTTAC TAACAATGCG TTCAGGTGCA AGCCAACGCT ACGCTGATCA
Bt israelensis  CAGGTGCTGA AGATGGCAA CAATATTTAC TAACAATGCG TTCAGGTGCA AGCCAACGCT ACGCTGATCA
B cereus        CAGGTGCTGA AGATGGCAA CAATATTTAC TAACAATGCG TTCAGGTGCA AGCCAACGCT ACGCTGATCA
Clustal Consensus
*****
850          860          870         880         890         900         910
Bt kurstaki      TACAGACTA AAGAAAATTT CTCAAATACT CGATTGGATT AATATTATGA CATATGATT CCACGGTGA
Bt sotto        TACAGACTA AAGAAAATTT CTCAAATACT CGATTGGATT AATATTATGA CATATGATT CCACGGTGA
Bt israelensis  TACAGACTA AAGAAAATTT CTCAAATACT CGATTGGATT AATATTATGA CATATGATT CCACGGTGA
B cereus        TACAGACTA AAGAAAATTT CTCAAATACT CGATTGGATT AATATTATGA CATATGATT CCACGGTGA
Clustal Consensus
*****
920          930          940         950         960         970         980
Bt kurstaki      TGGGAAGCTA CTCTAATCA TAATGCAGCT CTATATAAGG ATCCAAATGA TCCAGCAGCA AATACGAATT
Bt sotto        TGGGAAGCTA CTCTAATCA TAATGCAGCT CTATATAAGG ATCCAAATGA TCCAGCAGCA AATACGAATT
Bt israelensis  TGGGAAGCTA CTCTAATCA TAATGCAGCT CTATATAAGG ATCCAAATGA TCCAGCAGCA AATACGAATT
B cereus        TGGGAAGCTA CTCTAATCA TAATGCAGCT CTATATAAGG ATCCAAATGA TCCAGCAGCA AATACGAATT
Clustal Consensus
*****
990          1000         1010        1020        1030        1040        1050
Bt kurstaki      TTTACGTAGA TGGTCTATA AATGTTTATA CAAATGAAG TGTCCAGTC GATAAATCTG TATTAGGCGT
Bt sotto        TTTACGTAGA TGGTCTATA AATGTTTATA CAAATGAAG TGTCCAGTC GATAAATCTG TATTAGGCGT
Bt israelensis  TTTACGTAGA TGGTCTATA AATGTTTATA CAAATGAAG TGTCCAGTC GATAAATCTG TATTAGGCGT
B cereus        TTTACGTAGA TGGTCTATA AATGTTTATA CAAATGAAG TGTCCAGTC GATAAATCTG TATTAGGCGT
Clustal Consensus
*****
1060         1070         1080        1090        1100        1110        1120
Bt kurstaki      ACCCTTTTAC GGAAGTGGCT GGAAGATTTG TGGCAAAGAA AATAACGGAC AATATCAACC TTGCAAACCA
Bt sotto        ACCCTTTTAC GGAAGTGGCT GGAAGATTTG TGGCAAAGAA AATAACGGAC AATATCAACC TTGCAAACCA
Bt israelensis  ACCCTTTTAC GGAAGTGGCT GGAAGATTTG TGGCAAAGAA AATAACGGAC AATATCAACC TTGCAAACCA

```


Neste ponto o gene em questão passou a ser denominado *caciiichit* (*Coffea arabica* Class III Chitinase). A seqüência codificadora da região madura de *caciiichit* foi clonada no vetor pGAPZ α -B em fase com uma seqüência codificadora de um peptídeo sinal secretor na região N-Terminal da proteína recombinante denominado fator- α . Além do peptídeo sinal da região N-Terminal, a proteína recombinante apresentaria uma extensão na região C-Terminal de 6 histidinas, “(his)6 tag”. A seqüência de aminoácidos predita para o fragmento clonado constitui uma proteína de 34 kDa com pI 5.9 que difere da proteína predita pela seqüência nucleotídica do contig 14550 em quatro aminoácidos (Arg125Ser, Met231Ile, Gly264Arg, Gly276Asp) e uma inserção de Thr-Ile à montante de Ser279 (Figura 32). Tal diferença pôde ser explicada por uma variação genética natural entre plantas de café, visto que a variedade de café utilizada na composição da biblioteca de cDNA do Projeto Genoma Café não foi a mesma utilizada no processo de clonagem de *caciiichit*.

VI.III.III. Expressão e purificação de CacIIChit

Após a transformação genética da levedura com o vetor carregando *caciiichit* um ensaio de expressão em pequena escala foi realizado com 8 colônias para a detecção da proteína recombinante. Apesar da maior parte das colônias transformadas com pGAPZ α -B/*caciiichit* expressar uma proteína heteróloga como massa molecular entre 29 e 36 kDa (Figura 33), nenhum sinal foi detectado nas análises por Western blot com anticorpos Anti-Histag (Figura 34). Uma eletroforese foi realizada com o extrato protéico da cultura onde a proteína heteróloga era mais abundante. O peso molecular desta foi determinado como 32,7 kDa por meio de uma curva logarítmica de migração relativa (Figura 35), indicando que a proteína recombinante (massa predita: 34 kDa) poderia ter perdido a cauda de histidina e mais aproximadamente cinco dos últimos aminoácidos da região C-terminal, o que diminuiria sua massa em torno 1,2 kDa e explicaria a ausência de sinal nos ensaios do Western blot. A clivagem espontânea e específica de uma porção da região C-terminal de proteínas expressas em *P. pastoris* é um evento comum e bem descrito na literatura. Usualmente acontece devido às condições de cultivo e composição do meio, raramente afetando a atividade da proteína recombinante (Tanfous *et al.*, 2006). A colônia que expressava a proteína de 32 kDa em níveis satisfatórios, e uma que não expressava, foram analisadas por PCR de colônia para confirmar a integração de *caciiichit* (Figura 36). A colônia em questão mostrou-se positiva para a integração de *caciiichit*, sendo então selecionada para o ensaio de expressão em larga escala em fermentador.

>Contig 144550

____AGIATYWGQNTDEGSLEDACRRGTYDYVNLAFLLINYGNGQTPELNLAGHCERSACSSLSSEIKA
CQKRGIQVLLSLGGAPNLSRDDAKEVASLYLNFLGGESQNRPLGDAVLDGIDFHIQGGSRDFLDDL
AKALSEYRTTERRVHLSAAPQCFYDPDYLDAAIRTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSMGNANLNLSWSSH
WASHPGVNKLFLGLPASPEAAPSGGYIPHRMLIREVLPQIQDYPNYGGVMLWNVYDENYSQATIPYV
NPETLTFDRRSMLKYPRKSMIKSFVDE

>CacIIIChit

AGIQAGIATYWGQNTDEGSLEDACRRGTYDYVNLAFLLINYGNGQTPELNLAGHCERSACSSLSSEIKA
CQKRGIQVLLSLGGAPNLSRDDAKEVASLYLNFLGGESQNRPLGDAVLDGIDFHIQGGSRDFLDDL
AKALSEYRTTERRVHLSAAPQCFYDPDYLDAAIRTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSMGNANLNLSWSSH
WASHPGVNKLFLGLPASPEAAPSGGYIPHRMLIREVLPQIQDYPNYGGVMLWNVYDENYSQATIPYV
NPETLTFDRRS__KYPRKSMIKSFVDEVDHHHHHH

Figura 31: Sequência de aminoácidos da região madura das proteínas preditas pelas seqüências dos genes do contig 14550 e do gene *caciiichit*. A seqüência do gene *caciiichit* prediz uma proteína de 34 kDa e *pI* 5.9 com quatro substituições e duas deleções em relação a seqüência da proteína predita pelo gene do contig 14550, sendo elas: Arg125Ser, Met231Ile, Gly264Arg, Gly276Asp e uma deleção de Thr-Ile à montante a Ser279 (grifadas em preto). Grifados em cinza estão aminoácidos inseridos durante o processo de clonagem de *caciiichit* no vetor pGAPZ α -B.

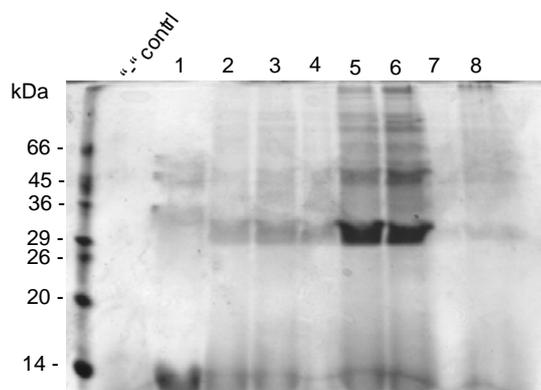


Figura 32: Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% para a detecção da proteína heteróloga em culturas de *P. pastoris* transformadas com pGAPZ α -B/*caciiichit*. Oito colônias transformadas com pGAPZ α -B/*caciiichit* foram utilizadas para inocular 10 mL de meio YPG líquido e as culturas foram deixadas crescer por 4 dias, após o que 24 μ L do meio de cultura foram adicionados a 6 μ L de tampão de amostra e aplicados no gel. Como controle negativo (“-“ contrl) foi utilizado o sobrenadante de uma cultura transformada com pGAPZ α -B vazio. Nas colônias de 2 à 8 foi observada uma banda heteróloga entre 29 e 36 kDa. O gel foi corado com Commassie Blue-R.

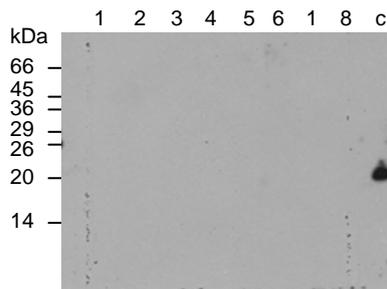


Figura 33: Western blot para a detecção da proteína heteróloga em culturas de *P. pastoris* transformadas com pGAPZ α -B/*caciiichit*. Oito colônias transformadas com pGAPZ α -B/*caciiichit* foram utilizadas para inocular 10 mL de meio YPG líquido e as culturas foram deixadas crescer por 4 dias, após o que 24 μ L do meio de cultura foram adicionados a 6 μ L de tampão de amostra e aplicados em um gel de eletroforese 12,5%. Após a corrida as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose que foi utilizada em análises por Western blot com anticorpos Anti-Histag. Nenhum sinal foi detectado em nenhuma das 8 colônias avaliadas. Como controle positivo (c) foram utilizados 600 η g uma proteína de 20 kDa portadora de uma cauda de histidina.

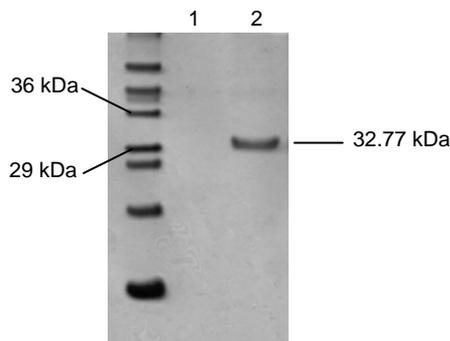


Figura 34: Determinação do peso molecular da proteína heteróloga por curva logarítmica de migração relativa. Duzentos microlitros do sobrenadante de duas culturas inoculadas com pGAPZ α -B/vazio (1) e pGAPZ α -B/*caciiichit* (2) respectivamente foram precipitados com 4 volumes de acetona gelada e solubilizados em 30 μ L de tampão de amostra. Deste volume, 10 μ L foram aplicados no gel de SDS-PAGE 12,5%. Por meio de uma curva logarítmica de migração relativa o peso molecular da proteína heteróloga foi determinado como 32,7 kDa, tendo portanto 1,3 kDa a menos que o predito pela seqüência do gene *caciiichit*.

Figura 35: PCR de colônia para confirmação da integração de pGAPZα-B/*caciiichit* na colônia que expressava a proteína heteróloga. Para a amplificação de *caciiichit* foram utilizados *primers* dos vetores da série pGAPZα. 1) Colônia transformada com pGAPZα vazio, 2) Colônia que não expressou a proteína heteróloga, 3) Colônia que expressou a proteína heteróloga, 4) Vetor pGAPZα-B/*caciiichit*. A banda de 1.300 bp visualizada em 3 e 4 corresponde a amplificação de *caciiichit* (918 bp) mais os 540 bp amplificados pelos *primers* do vetor.

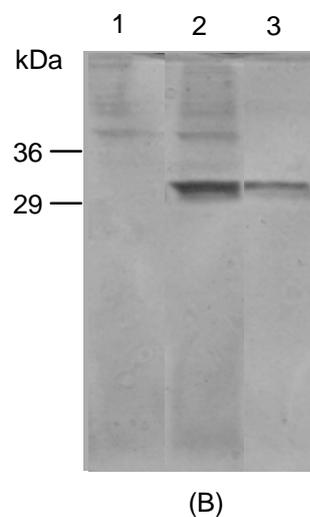
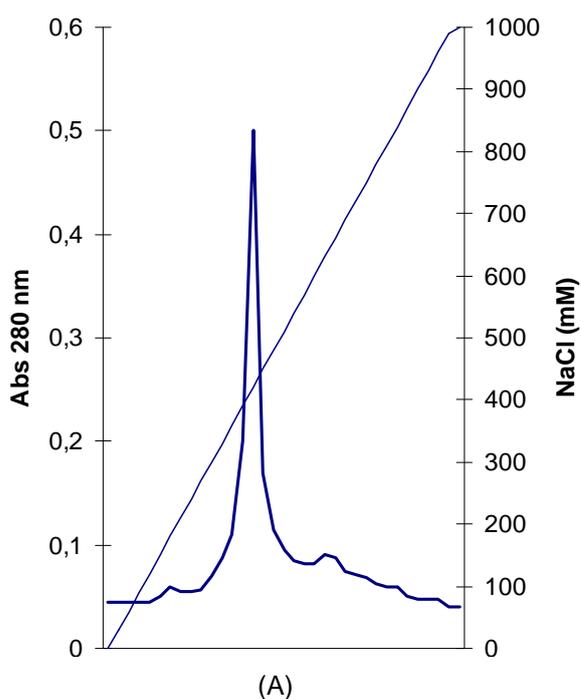
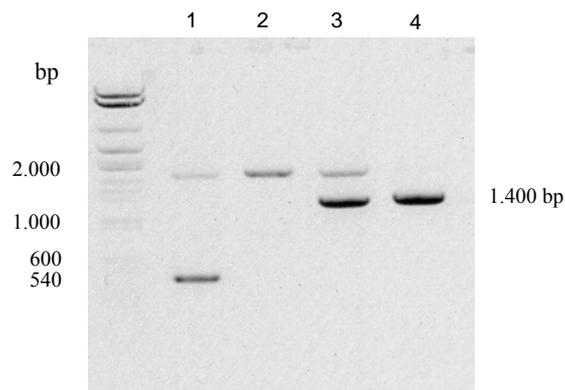


Figura 36: Purificação de CacIIChit. A) Cromatograma obtido por cromatografia de troca iônica. A proteína mais abundante da amostra começou a ser eluída com 350 mM de NaCl. B) SDS-PAGE das amostras obtidas durante o processo de expressão e purificação de CacIIChit. 1. Proteínas do sobrenadante de uma cultura inoculada com *P. pastoris* transformada com pGAPZα-B vazio; 2. Proteínas do sobrenadante de uma cultura inoculada com *P. pastoris* transformada com pGAPZα-B/*caciiichit*; 3. CacIIChit eluída da cromatografia de troca iônica com NaCl 350 mM. As proteínas foram precipitadas de 200 μL de cada fração com 4 volumes de acetona gelada, solubilizadas em 50 μL de Tampão de amostra e 10 μL foram aplicados em um SDS-PAGE 12,5%. Uma proteína de 32 kDa foi purificada por cromatografia de troca iônica. O gel foi corado com Commassie Blue-R.

A proteína recombinante foi purificada do meio de fermentação por cromatografia de troca iônica, sendo eluída com aproximadamente 350 mM de NaCl (Figura 37). As frações purificadas foram avaliadas por SDS-PAGE (Figura 37). Em torno de 70 mg da proteína recombinante foram produzidos pelos processos de expressão e purificação, o que corresponde a uma taxa de expressão de 23 mg/L, um valor quatro vezes maior que o reportado por Fitches e colaboradores (Fitches *et al.*, 2004b).

VI.III.IV. Ensaio de atividade quitinolítica

Três amostras representando estágios dos procedimentos de expressão e purificação de CacIIIChit foram dializadas contra Tampão Fosfato de Sódio 80 mM pH 6.8 e avaliadas em um ensaio de atividade quitinolítica, sendo elas: extrato bruto de uma cultura inoculada com pGAZ α -B vaizo (amostra 1), extrato bruto de uma cultura inoculada com pGAZ α -B/*caciiiichit* (amostra 2), e CacIIIChit purificada por cromatografia de troca iônica com NaCl 350 mM (amostra 3) (Figura 38). A amostra 2 mostrou apenas 8% mais atividade que as proteínas endógenas de *P. pastoris* (amostra 1) e, quando purificada, CacIIIChit apresentou 28% menos atividade que a amostra 1. Os valores encontrados não aumentaram quando os ensaios foram repetidos em pHs variando de 4.8 à 8.8. Esses resultados mostraram uma leve atividade quitinolítica residual não coerente com o esperado para 5 μ g de uma quitinase purificada. CacIIIChit mostrou-se uma quitinase de classe III inativa, algo já relatado na literatura tendo como a Concanavalina B o exemplo mais estudado dessa classe de molécula (Hening *et al.*, 1995).

Devido à natureza bioquímica constatada para a proteína codificada pelo gene *caciiiichit*, foi decidido por abortar os experimentos de fusão de cry8 *caciiiichit*. Visto que a fusão planejada não iria conferir à molécula recombinante (Cry8/Chitinase) a atividade enzimática almejada pelo projeto.

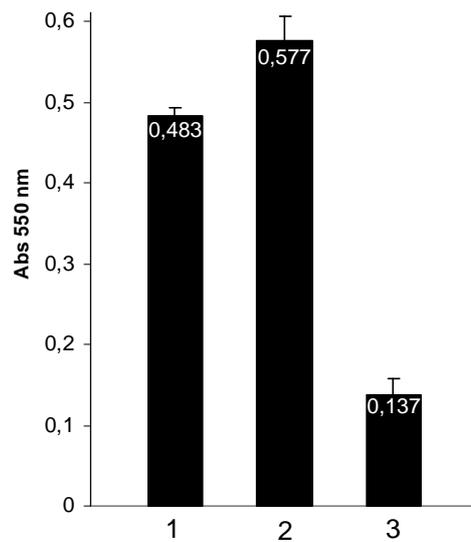


Figura 37: Ensaio de atividade quitinolítica com as frações protéicas obtidas durante a expressão e purificação de CacIIIChit. Todas as amostras da figura 37(B) foram dialisadas contra Tampão de Reação (TR) (Fosfato de Sódio 80 mM pH 6.8) e 5 µg de cada amostra foram utilizados nos ensaios. 1. Proteínas do sobrenadante de uma cultura inoculada com *P. pastoris* transformada com pGAPZα-B vazio; 2. Proteínas do sobrenadante de uma cultura inoculada com *P. pastoris* transformada com pGAPZα-B/*caciiiichit*; 3. CacIIIChit eluída da cromatografia de troca iônica com NaCl 350 mM. O mesmo ensaio foi realizado em pH 4.8, 5.8, 7.8 e 8.8, sem nenhuma variação significativa.

VI.IV. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os ensaios para a amplificação de uma quitinase de *B. thuringiensis* S811 obtiveram resultados negativos, assim a clonagem deste gene teve de ser abortada única e exclusivamente devido a necessidade de se cumprir o cronograma do projeto de estágio de doutorado no exterior cuja bolsa foi implementada em agosto de 2008. Os ensaios para a amplificação do gene em questão voltarão a ser realizados com a conclusão desta tese testando-se novas variáveis nas reações de PCR ou utilizando-se *primers* degenerados. Existe um interesse particular deste autor, e do grupo de pesquisa em geral, em avaliar a capacidade inseticida de enzimas *N*-acetilglicosaminidásicas endógenas de *B. thuringiensis* S811 contra coleópteros, em especial, o Bicudo-do-algodoeiro.

A quitinase de café recombinante, CacIIIChit, perdeu um porção da região C-terminal durante o processo de expressão, o que incluía a cauda de histidina, impedindo-a de ser visualizada por Western blot e purificada por cromatografia de afinidade. Porém, por cromatografia de troca iônica foi possível purificar a proteína recombinante numa razão de 23 mg/l, uma alta taxa em relação ao usualmente descrito na literatura.

Ensaio de atividade quitinolítica indicaram que CacIIIChit não apresentava atividade, pertencendo a uma classe de quitinases de classe III de plantas naturalmente inativas, como a Concanavalina B. Resultados posteriores vieram a comprovar essa afirmação. Neste ponto o plano de ação de fusão da toxina Bt BI-25 com a quitinase de café teve de ser abortado, pois a fusão planejada não iria conferir à molécula recombinante a propriedade bioquímica desejada.

De posse de aproximadamente 70 mg de CacIIIChit purificada, ensaios posteriores seriam realizados afim de se esclarecer o papel biológico dessa molécula, cujo gene era altamente transcrito em tecidos de café sob estresse biótico, no metabolismo vegetal.

INTERLÚDIO 2

Revelado que CacIIIChit era uma quitinase inativa, o plano de ação para utilização do gene *caciiiichit* em fusão com Cry8 para o controle do bicudo-do-algodoeiro teve de ser abortado. Porém algumas questões intrigantes surgiram: “*Por que o gene ortólogo a caciiiichit, encontrado no contig 14550 do Genoma Café, era altamente expresso em tecidos de café submetidos a estresse biótico?*” “*Qual seria então sua função biológica?*” Uma análise estrutural mais detalhada da proteína codificada por *caciiiichit* responderia essa pergunta e revelaria um elegante mecanismo de evolução molecular na interação planta-praga que proporcionou o surgimento de uma nova classe de proteínas dentro da família das quitinases de plantas. Essa nova classe de proteína também atuaria na interação planta-praga e, como constatado pelos ensaios apresentados no próximo capítulo, o “novo” *caciiiichit* carregava consigo um grande potencial a favor do agronegócio brasileiro: atividade contra *Phakopsora pachyrhizi*, a terrível Ferrugem asiática que desde 2001 vem comprometendo a produção de soja no Brasil.

VII. CAPÍTULO 3

**UMA NOVA PROTEÍNA INIBIDORA DE XILANASE SIMILAR
A QUITINASE DE CAFÉ (*Coffea arabica*) QUE AFETA A
GERMINAÇÃO DE ESPOROS DA FERRUGEM ASIÁTICA
(*Phakopsora pachyrhizi*)**

VII.I. INTRODUÇÃO AO TERCEIRO CAPÍTULO

A superfície da planta é um complexo campo de batalha molecular durante a interação planta-patógeno. Durante a infecção as células de plantas produzem grupos de proteínas codificadas por genes não homólogos denominadas coletivamente de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRPs). Atualmente existem 17 famílias de PRPs agrupadas de acordo com a atividade biológica de cada uma, que pode variar de enzimas degradadoras da parede/membrana celular, inibidores de proteases e proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo (Sels *et al.*, 2008). Cada família de PRP tem seu momento de ação específico durante a interação planta-patógeno, algumas delas atuarão como moléculas de ataque tentando eliminar o patógeno, outras atuarão como moléculas de contra-ataque, para proteger as células da planta contra o ataque molecular do patógeno (Figura 9). Misas-Villamil e Hoorn revizaram recentemente esses aspectos do mecanismo em “zig-zag” da interação molecular entre plantas e patógenos (Misas-Villamil & Hoorn, 2008).

Em 1999 McLauchlan e colegas descreveram uma nova classe de proteínas inibidoras de xilanases similares a quitinases de classe III de plantas (McLauchlan *et al.*, 1999). Logo depois pesquisas subseqüentes mostraram que aquelas moléculas descritas por McLauchlan compreendiam uma nova classe de proteínas de defesa vegetal, então denominadas XIP (*Xylanase Inhibitor Proteins*), que havia recentemente evoluído dentro da família 18 das Glicosil Hidrolases, grupo que contém as quitinases de classe III de plantas (família PRP 8). Tais moléculas correspondem a quitinases naturalmente inativas apresentando topologia $(\beta/\alpha)_8$, típica das quitinases de classe III de plantas, e que perderam sua atividade enzimática devido a mutações no domínio catalítico. Contudo, estas moléculas continuaram atuando na interação planta-praga, porém não mais como hidrolases que atacavam a parede celular do patógeno, e sim numa outra frente do campo de batalha, como inibidores de hidrolases, bloqueando a ação das enzimas degradadoras da parede celular vegetal, produzidas pelos patógenos: as xilanases (família 10 e 11 das glicosil hidrolases). Em trigo, um inibidor de xilanase similar a quitinase (XIP-I) teve sua estrutura tridimensional elucidada (Payan *et al.*, 2003) e seu mecanismo de inibição proposto (Payan *et al.*, 2003). Aspectos estruturais dessas moléculas, bem como o mecanismo de interação com as xilanases foram revistos recentemente (Misas-Villamil & Hoorn, 2008).

Voltando a atenção para CacIIIChit, da qual 70 mg foram produzidos em fermentador, análises estruturais, bem como a desconsiderável atividade quitinolítica apresentada, e o fato do seu gene ser transcrito em resposta a estresse biótico, mais precisamente em tecidos de café

infectados com o nematóide *Melodoygine incognita* ou com a bactéria *Xylella fastidiosa*, indicaram que CaclXIP provavelmente pertenceria a classe das proteínas inibidoras de xilinas, passando então a ser denominada CaclXIP (*Coffea arabica* Chitinase-Like Xylanase Inhibitor Protein). Características como a atividade quitinolítica residual apresentada por CaclXIP, seu alto grau de similaridade de seqüência com uma quitinase de classe III de planta modelo (Hevamina) e seu baixo grau de similaridade com uma proteína inibidora de xilanase modelo (XIP-I), sugerem que a divergência de CaclXIP do grupo das quitinasas tenha ocorrido há pouco tempo.

Neste capítulo serão apresentados os dados da análise estrutural que levou a suposição de que a proteína recombinante produzida tratava-se de uma XIP, bem como os dados bioquímicos que comprovaram essa suposição. Ensaio enzimáticos com a proteína recombinante purificada mostraram que a molécula era capaz de inibir em 57% a atividade de xilanasas purificadas de *Acrophialophora nainiana* quando ensaiadas em uma razão de 12:1 (enzima:inibidor). Adicionalmente CaclXIP mostrou-se capaz de inibir em 45% a germinação de esporos da Ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) quando os ensaios eram realizados na presença de 1,5 µg/µL de CaclXIP. Tais resultados fazem de CaclXIP uma molécula potencialmente candidata para utilização em programas biotecnológicos que visem a contenção de *P. pachyrhizi*, uma doença de difícil controle que nos últimos 9 anos vem comprometendo a produção de soja no Brasil.

VII.II. METODOLOGIA

VII.II.I. Predição de estruturas secundárias de CaclXIP por homologia e comparação com outros membros da família GH 18

Para a predição das estruturas secundárias de CacIIIChit, arquivos PDB foram gerados utilizando-se o software 3D-JIGSAW on line (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>). As estruturas obtidas foram comparadas as estruturas secundárias de Hevamina (accession number: DQ873889), Concanavalina B (a. n.: P49347) e XIP-I (a. n.: Q8L5C6). O alinhamento entre as estruturas secundárias foi realizado utilizando-se a ferramenta de alinhamento Jalview 2.4 (Clamp *et al.*, 2004) e melhorada manualmente até que a alocação satisfatória de blocos conservados e identidade de aminoácidos fosse obtida. O modelo foi validado com a ferramenta PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

VII.II.II. Ensaio de Inibição de atividade xilanásica

Frações de proteínas com atividade xilanásica foram obtidas a partir do cultivo de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Acrophialophora nainiana* de acordo com o protocolo descrito por Salles (Salles *et al.*, 2000). Os ensaios de inibição de atividade xilanásica foram realizados em um volume final de 150 μ L contendo 1% (w/v) de xilana comercial (Oat Spelt Xylan), 60 μ g de xilanases, e 5 μ g CaclXIP. As reações foram mantidas a 50 °C por 30 min e então 300 μ L de reagente DNS (Bailey *et al.*, 1992) foi adicionado, seguido de fervura por 10 min. Posteriormente 1,5 mL de água destilada foram adicionados e a absorbância foi medida a 540 nm. Os ensaios foram repetidos em triplicata.

VII.II.III. Ensaio de inibição da germinação dos esporos de *Phakopsora pachyrhizi*

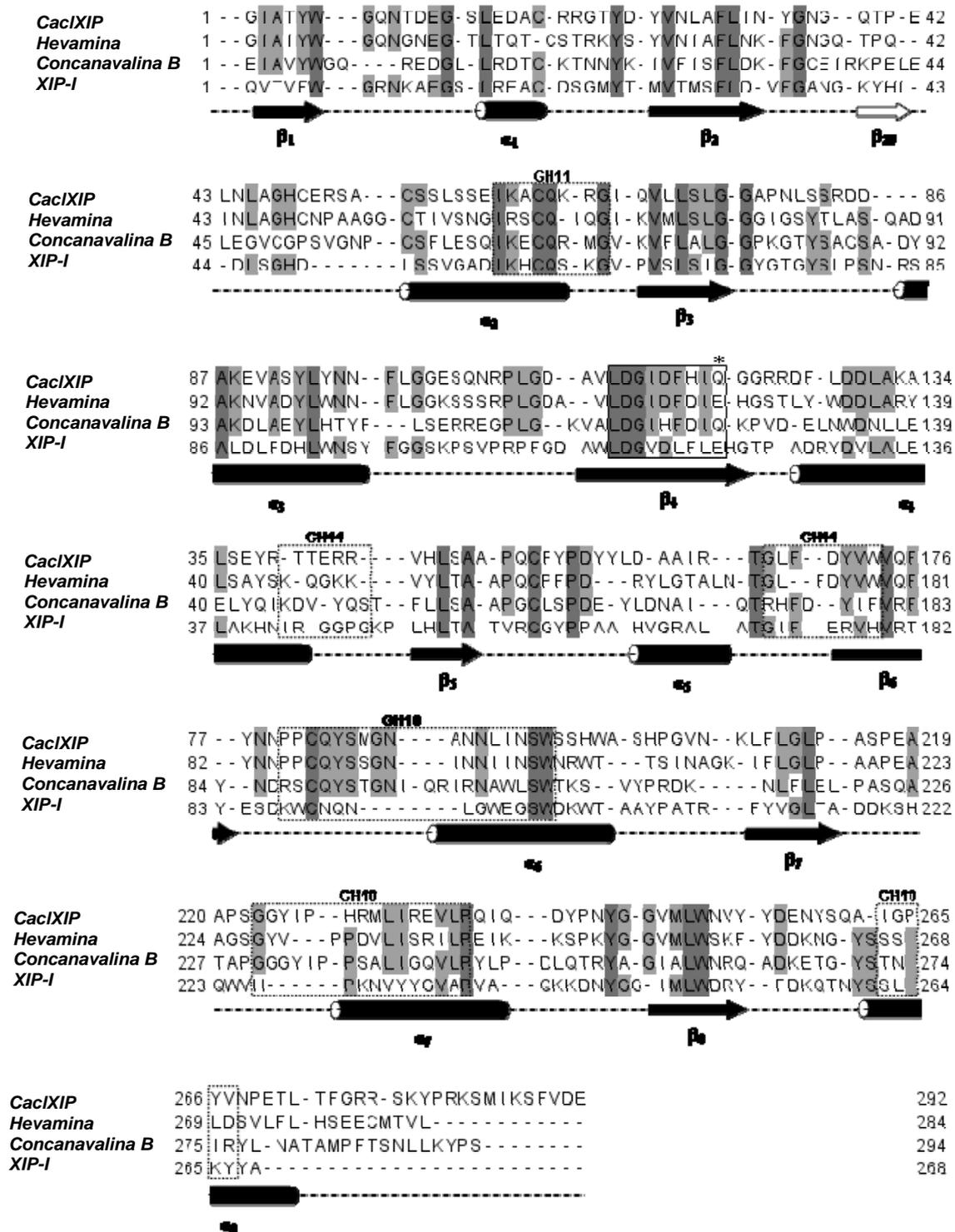
Plantas de soja infectadas por *P. Pachyrhizi* foram mantidas em casa de vegetação para serem usadas como fonte de esporos. Para a coleta dos esporos, folhas infectadas foram levemente agitadas e os esporos que naturalmente se soltavam eram coletados sobre uma folha de papel. Os esporos coletados foram imediatamente diluídos em água contendo 0,01% (v/v) Tween 20 para uma concentração de 2×10^4 esporos/mL. CacIIIChit foi diluída em 10 mM Tris-HCl pH 6.8 para a concentração de 3,0 μ g/ μ L. O bioensaio foi realizado em placas de 96 poços. O teste para a inibição da germinação dos esporos foi realizado com 50 μ L de CaclXIP 3,0 μ g/ μ L em 50 μ L da solução de esporos 2×10^4 esporos/mL. O controle negativo consistia de

50 μ L da solução 10 mM Tris-HCl pH 6.8 sem CaCl₂. As placas foram incubadas a 25 °C em uma câmara de germinação durante a noite. Lactofenol foi utilizado para parar o ensaio e os esporos germinados foram contados por estereomicroscopia em campos com 100 esporos.

VII.III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII.III.I Comparação de CaclXIP com outras proteínas da família GH18 e proteínas similares às GH18

Quitinases de classe III de plantas pertencem a família 8 das Proteínas Relacionadas a Patogênese (PR-8) (Sels *et al.*, 2008). Tal classe de glicosil hidrolase é caracterizada por uma topologia do tipo Barril (β/α)₈ e um sítio ativo composto por dois resíduos de ácido aspártico (D) e um ácido glutâmico (E) (como resíduo catalítico) geralmente separados por fenilalanina e isoleucina (DxDxE). Hevamina é uma bem caracterizada quitinase de classe III de planta. Sua estrutura tridimensional foi obtida por dados cristalográficos (Scheltinga *et al.*, 1996) e seu mecanismo de catálise já foi esclarecido (Scheltinga *et al.*, 1995). Em todo o genoma do Café existem pelo menos 4 contigs carregando seqüências completas que predizem quitinases de classe III (contigs 18766, 7978, 14163, e 20121) que partilham de 54 à 57% de identidade com a Hevamina (dados não mostrados). O contig 14550, também anotado como uma quitinase de classe III, apesar de possuir uma seqüência nucleotídica que prediz uma topologia do tipo Barril (β/α)₈, partilha não mais que 53% de identidade com a Hevamina, em adição, o sítio catalítico predito se apresenta como “DFHIQ”, onde uma glutamina substitui o ácido glutâmico catalítico (Figura 39). Tal substituição, foi demonstrado, é fatal para a atividade quitinolítica (Suzukawa *et al.*, 2003; Papanikolau *et al.*, 2001). Estas evidências sugeriam que a seqüência encontrada no contig 14550 pertencia a um grupo de quitinases de classe III de plantas naturalmente inativas, como a Concanavalina B (Hennig *et al.*, 1995), que recentemente evoluiu dentro da família PR-8. Este novo grupo de proteínas continua sendo útil para a defesa da célula vegetal por permitir o surgimento de novas propriedades bioquímicas em tais moléculas, neste caso, como inibidores de xilanases. A figura 39 mostra o alinhamento das estruturas secundárias de CaclXIP com outros membros da família GH18. Como é de conhecimento corrente, as folhas β_4 e β_8 são regiões importantes para a interação com o substrato e a atividade quitinásica (Suzukawa *et al.*, 2003). Tais regiões são altamente conservadas em outros membros da família GH18, mesmo naquelas que não apresentam atividade enzimática, provavelmente pelo seu papel em manter a topologia (β/α)₈, a qual é fundamental para a atividade de inibição de xilanases (Vilamil & Hoorn, 2008). As regiões compreendendo o antigo sítio quitinolítico de CaclXIP e as prováveis porções de interação com os sítios ativos de xilanases GH10 e GH11 são indicados na figura 39. De acordo com o alinhamento, CaclXIP partilha mais identidade com Hevamina (53%) do que com XIP-I (29%), o que sugere que CaclXIP tenha evoluído da família GH18 mais recentemente que XIP-I. Diferente de CaclXIP, XIP-I permaneceu com o Ácido Glutâmico



Nome	Tam (AA)		Nome	Tam (AA)	Identidade (%)
Hevamina	284	X	CacIXIP	292	53
hevamina	284	X	Concanavalina B	294	40
Hevamina	284	X	XIP-I	268	33
CacIXIP	292	X	Concanavalina B	294	42
CacIXIP	292	X	XIP-I	268	29
Concanavalina B	294	X	XIP-I	268	27

catalítico em seu antigo sítio ativo, contudo sua cadeia lateral parece estar totalmente envolvida em pontes de sal com dois resíduos de arginina vizinhos (Arg158 e Arg181) (Juge *et al.*, 2004). Tem sido sugerido que essas pontes de sal impedem XIP-I de atuar como uma quitinase (Payan *et al.*, 2003). Essas duas moléculas parecem revelar duas diferentes rotas evolutivas para o surgimento da atividade inibitória para xilanases dentro da família GH18; uma delas como “Glu persistente”, que pressupõe uma molécula intermediária com atividade quitinolítica e atividade inibitória para xilanases simultaneamente; e outra como “Glu carente”, que sugere o surgimento da atividade inibitória para xilanases em um grupo de quitinases naturalmente inativas, como a Concanavalina B.

VII.III.II. Avaliação de CaclXIP na defesa vegetal

CaclXIP foi utilizada em um ensaio de inibição contra uma fração xilanásica complexa de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Acrophialophora nainiana*. Nenhuma inibição foi observada contra xilanases de *A. flavus*, contudo CaclXIP inibiu xilanases de *A. nainiana* e *A. Níger* em 56% e 19,5%, respectivamente, quando ensaiadas na proporção 12:1 (m/m) enzima:inibidor (Tabela 7). Tais valores são significativamente mais altos que os apresentados por MacLauchlan, o qual mostrou uma atividade inibitória de 83% contra xilanases purificadas de *A. niger* e 54% contra xilanases de *Trichoderma viride*, numa razão de 1:13 (m/m) enzima:inibidor no primeiro caso, e de 1:23 (m/m) no último (MacLauchlan *et al.*, 1999). É necessário considerar que os ensaios de MacLauchlan foram realizados com xilanases purificadas enquanto CaclXIP foi testada contra uma fração enriquecida em xilanases. Mais recentemente Pollet e colegas mostraram que uma XIP de trigo inibiu em 43% a atividade de xilanases GH10 purificadas de *Fusarium graminearum* quando 7 pmol de xilanases foram incubados com 1 µg of inibitor (Pollet *et al.*, 2009).

Apesar de diferentes grupos terem reportado que XIP-I não é ativa contra xilanases de bactérias (Flatman *et al.*, 2002, Juge *et al.*, 2004, Durand *et al.*, 2005), o gene para CaclXIP é altamente transcrito em folhas de café infectadas com *Xylella fastidiosa* (dados da biblioteca de cDNA do Genoma Café). Contudo ainda é cedo para se especular se CaclXIP poderia estar agindo contra xilanases bacterianas, uma vez que o papel deste tipo de molécula no metabolismo das plantas está longe de ser bem entendido. Como Igawa e colegas relataram, a transcrição de XIP-I pode ser induzida por patógenos ou por estresse abiótico, como injúria ou tratamento com metil jasmonato (Igawa *et al.*, 2005). Em arroz, três diferentes XIP foram

Tabela 7: Avaliação da atividade inibitória de CaclXIP para xilanases de *Aspergillus niger* e *Acrophialophora nainiana*

Tratamento	Atividade Xilanásica (Abs 540 nm)	Inibição (%)
<i>A. niger</i> xilanase	0,365 ± 0,057	Não aplicável
<i>A. niger</i> xilanase + CaclXIP	0,294 ± 0,010	19.5 ± 3.4
<i>A. nainiana</i> xilanase	0,211 ± 0,018	Não aplicável
<i>A. nainiana</i> xilanase + CaclXIP	0,092 ± 0,009	57 ± 9

* Xilanases de *A. Níger* e *A. nainiana* (60µg) foram incubadas com 5 µg de CaclXIP (razão enzima:inibidor 12:1 [w/w]) como descrito na Metodologia. Atividade xilanásica e a percentagem de inibição estão expressas com o D.P. representado por ±, n=3.

também induzidas por fitormônios e injúria em diferentes tecidos (Tokunaga & Esaka, 2007). Croes e colegas mostraram que três classes de XIP são acumuladas nos tecidos de trigo durante o crescimento e desenvolvimento de plantas saudáveis (Croes *et al.*, 2009). Ando descreveu um grande número de genes similares a genes de XIP transcritos em folhas e raízes de trigo, dos quais poucos deles eram de resposta ao patógeno (Ando *et al.*, 2007). Tais informações ilustram a atual obscuridade da função das proteínas inibidores de xilanases no metabolismo vegetal como um todo.

VII.III.III. Contenção da germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* por CaclXIP

Desde que a Ferrugem asiática da soja chegou ao Brasil em 2001 seu controle vem sendo feito por fungicidas químicos do grupo dos Triazols, Estrobilurinas e Benzimidazols, os quais já foram relacionados a desordens neurológicas, imunológicas e reprodutivas em mamíferos, bem como por interrupção da mitose (Filipov & Lawrence, 2001; Whittaker & Faustman, 1992). Scherm e colegas reportaram a eficácia do uso de uma combinação destes fungicidas na redução da doença em até 58% (Scherm *et al.*, 2009). Contudo, até agora, nenhuma abordagem biotecnológica de baixo impacto ambiental foi proposta para o controle de *P. pachyrhizi* nos campos de soja. Quando testada a 1,5 µg/µL, CaclXIP foi capaz de inibir em 45% a germinação de esporos de *P. pachyrhizi* (Tabela 8). Interessantemente a inibição da degradação de xilana não poderia ser o fator crucial para a contenção da germinação dos esporos, uma vez que não havia xilana no meio de ensaio. Tanto quanto é sabido, esta é a primeira vez que uma XIP é relatada como afetando o metabolismo de fungos em uma outra maneira que não seja interferindo na degradação de xilana. Aqui foi reportado o primeiro passo para uma possível utilização biotecnológica de CaclXIP para o controle da Ferrugem asiática.

Tabela 8: Avaliação da atividade de CaclXIP sobre a germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*

Tratamento	Esporos germinados (%)
Controle	99 ± 1
CaclXIP 1.5 µg/µL	55 ± 5

* Percentagem de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* germinados em incubação com CaclXIP 1,5 µg/µL em Tris-HCl 10 mM pH 6.8. Percentagem de esporos germinados está expressa com o D.P. representado por ±, n=3.

VII.IV. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A família 18 das glicosil hidrolases é um complexo e multifuncional grupo de proteínas de plantas originalmente designado para representar uma classe das quitinases de plantas. O conhecimento emergente sobre esse grupo está mostrando que apesar de seus componentes partilharem similaridades topológicas, tais moléculas podem representar os mais diferentes papéis no metabolismo das plantas, desde resposta a estresse biótico e abiótico ao desenvolvimento ontogenético. Alguns desses papéis continuam não muito bem entendidos. Qualquer que possa ser esse papel, a importância da família GH18 na defesa de plantas contra a infecção por fungos é um fato e pode acontecer em diferentes estágios do modelo em “zig-zag” de ataque e contra-ataque na evolução molecular da interação planta-praga (Vilamil & Hoorn, 2008). CaclXIP, como um membro desse grupo, tem potencial para ser explorada como uma alternativa para o controle de infecções fúngicas sobre as plantas, uma vez que sua atividade possa ser melhorada por técnicas de evolução molecular *in vitro*, por exemplo (Craveiro *et al.*, 2009), o que certamente iria ajudar no entendimento do seu mecanismo de contenção da germinação de esporos de *P. pachyrhizi*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P., GOUZY, J., AURY, J.M., SERENO, P.G., DANCHIN, E.G.J., DELEURY, E., BARBEOCH, L.P., ANTHOUARD, V., ARTIGUENAVE, F., BLOK, V.C., CAILLAUD, M.C., COUTINHO, P.M., DASILVA, C., DE LUCA, F., DEAU, F., ESQUIBET, M., FLUTRE, T., GOLDSTONE, J.V., HAMAMOUCHE, N., HEWEZI, T., JAILLON, O., JUBIN, C., LEONETTI, P., MAGLIANO, M., MAIER, T.R., MARKOV, G.V., MCVEIGH, P., PESOLE, G., POULAIN, J., RECHAVI, M.R., SALLET, E., SÉGURENS, B., STEINBACH, D., TYTGAT, T., UGARTE, E., VAN GHELDER, C., VERONICO, P., BAUM, T.J., BLAXTER, M., ZACHEO, T.B., DAVIS, E.L., EWBANK, J.J., FAVERY, B., GRENIER, E., HENRISSAT, B., JONES, J.T., LAUDET, V., MAULE, A.G., QUESNEVILLE, H., ROSSO, M.N., SCHIEX, T., SMANT, G., WEISSENBACH, J., WINCKER, P. **Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita***. *Nature Biotechnology*, v.26, n.8, p.909-915. 2008.
- ADAMCZYK, J.J. & MAHAFFEY, J.S. **Efficacy of VIP3a and Cry1Ab transgenic traits in Cotton against various Lepidopteran pests**. *Florida Entomologist*, v.91, n.4, p.570-575. 2008.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Science. 5th ed. p.1268, 2008.
- ALVES, S.A.M., FURTADO, G.Q., CARNEIRO, L.C., GODOY, C.V., BERGAMIN-FILHO, A. **Influência da temperatura no período latente da Ferrugem asiática da soja**. *Suma Phytopathologica*, v.32, p.71, 2006.
- ANDO, N.T., INABA, M., OHSATO, S., IGAWA, T., USAMI, R., KIMURA, M. **Identification of multiple highly similar XIP-type xylanase inhibitor genes in hexaploid wheat**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.360, p.880-884. 2007.
- ANTONIW, J.F., RITTER, C.E., PIERPOINT, W.S., VAN LOON, L.C. **Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV**, *Journal of General Virology*, v.47, p.79-87. 1980.
- APUYA, N.R., FRAZIER, B.L., KEIM, P., ROTH, E.J., AND LARK, K.G. **Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill**. *Theoretical and Applied Genetics*, v.75, p.889-901. 1988.
- AVIGNONE-ROSSA. C., MIGNONE, C.F. ***Bacillus thuringiensis* growth and toxicity**. *Molecular Biotechnology*, v.4, p.55-71. 1995.
- BAILEY, M.J., BIELY, P., POUTANEN, K. **Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity**. *Journal of Biotechnology*. 23: 257-270. 1992.
- BARBAS III, CF.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K., SILVERMAN, G.J. *Phage Display A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 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.J. **Control of coleopteran insect pests through RNA interference**. *Nature Biotechnology*, v.25, p.1322-1326. 2007.
- BAUM, J.A., CHU, C.R., RUPAR, M., BROWN, G.R., DONOVAN, W.P., HUESING, J.E., ILAGAN, O., MALVAR, T.M., PLEAU, M., WALTERS, M., VAUGHN, T. **Binary Toxins from *Bacillus***

- thuringiensis* active against the Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. Applied and Environmental Microbiology, v.70, p.4889–4898. 2004.
- BAXTER, I., HOSMANI, P.S., RUS, A., LAHNER, B., BOREVITZ, J.O., MUTHUKUMAR, B., MICKELBART, M.V., SCHREIBER, L., FRANKE, R.B., SALT, D.E. **Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in rabidopsis.** Plos Genetics, v.5, n.5, p.1-12. 2009.
- BEDNARCZYK, A., KOZON, E.G.D. **Pathogenic features of bacteria from the *Bacillus cereus* group.** Postepy Mikrobiologii, v.47, p.51-63. 2008.
- BENCHIMOL, R.L., EL-HUSNY, J.C., BARRIGA, J.P., FILHO, A.S., YORINORI, J.T., ANDRADE, E.B. **A Ferrugem asiática da soja no estado do Pará, safras 2003/04 e 2004/05.** Embrapa. Comunicado Técnico, Dezembro 2005.
- BHALLA, R., DALAL, M., PANGULURI, S.K., JAGADISH, B., MANDAOKAR, A.D., SINGH, A.K., KUMAR, P.A. **Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*.** FEMS Microbiology Letters, v.243, p.467–472. 2005.
- BIZZARRI, M.F., BISHOP, A.H., DINSDALE, A., LOGAN, N.A. **Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium.** Journal of Applied Microbiology, v.104, p.60–69. 2007.
- BONATO, E.R., BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística.** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 61p 1987.
- BRADFORD, M.M. **Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254. 1976.
- BRAR, S.K., VERMA, M., TYAGI, R.D., VALERO, J.R., SURAMPALLI, R.Y. ***Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater and wastewater sludge - Presence and characterization of chitinases.** Environmental Technology, v.29, p.161-170. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico da agroenergia / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** – Brasília : Mapa/ACS, 160 p, 2009.
- BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERON, M. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** Toxicon, v.49, n.4, p.423-435. 2007.
- BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F.J., PENA, G., VALDEZ, M.E.N., SOBERON, M., QUINTERO, R. **Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection.** Applied and Environmental Microbiology, v.64, p.4965-4972. 1998.
- BRITO, N., ESPINO, J.J., GONZALEZ, C. **The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*.** Molecular and Plant Microbe Interaction, v.19, p.25–32. 2006.
- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. pp. 1367. 6th impression Oct 2006. Copyright 2000.
- BUITRAGO, M.L.P., FREDERICK, R.D. **Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*.** Fungal Genetics and Biology, v.42, p.949–962. 2005.

- CALVO, E.S., SIQUERI, F., KIIHL, R.A.S., HARADA, A., GARCIA, A., KOGA, L., HIROMOTO, D.M., TAKEDA, C., SUZUKI, S., NOUCHI, A.K., OTUBO, S.T., YUYAMA, M.M. **Genética e melhoramento para resistência a Ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja (*Glycine max* L.)**. Em: Anais do Simpósio brasileiro de Ferrugem asiática da soja. Londrina: Embrapa Soja. p.131, 2007.
- CAMASSOLA, M., DILLON, A.J.P. **Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation**. Journal of Applied Microbiology, v.103, p.2196–2204. 2007.
- CAMPO, C.B.H., SARAIVA, O.F. **Resultado de pesquisa da Embrapa Soja – 2000: entomologia**. Londrina, Embrapa Soja, p.42, 2001.
- CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SA, M.F. **Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides**. Toxicon, v.40, p.1515–1539. 2002.
- CARTER, T.E.JR., NELSON, R.L., SNELLER, C.H., CUI, Z. **Genetic diversity in soybean**. In H.R. Boerma and J.E. Specht (Eds.) Soybeans: Improvement, Production and Uses. 3rd Edition. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, pp.303–416. 2004.
- CARVALHO, A.A.J., FIGUEREDO, M.B. **A verdadeira identidade da Ferrugem da soja no Brasil**. Summa Phytopathologica, v.26, p.197-200. 2000.
- CHU, H.H., HOANG, V., HOFEMEISTER, J., SCHREMPF, H. **A *Bacillus amyloliquefaciens* ChbB protein binds b- and a-chitin and has homologues in related strains**. Microbiology, v.147, p.1793-1803. 2001.
- CLAMP, M., CUFF, J., SEARLE, S.M. AND BARTON, G.J. **The Jalview Java alignment editor**. Bioinformatics, v.20, p.426–427. 2004.
- COLLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K. **Plant chitinases**. Plant Journal, v.3, p.31-40. 1993.
- COLLINS, T., DE VOS, D., HOYOUX, A., SAVVIDES, S.N., VAN BEEUMEN, C.G.J., FELLER, G. **Study of the active site residues of a glycoside hydrolase family 8 xylanase**. Journal Molecular Biology, v.354, p.425–435. 2005.
- COLLINS, T., MEUWIS, M.A., STALS, I., CLAEYSSENS, M., FELLER, G., GERDAY, C. **A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization**. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.38, p.35133–35139. 2002.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira : grãos, nono levantamento, junho/2009 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2009. 39 p.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária. Novembro 2006. Disponível também em: www.conab.gov.br
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária. Novembro/Dezembro 2007. Disponível também em: www.conab.gov.br
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária. Dezembro 2008. Disponível também em: www.conab.gov.br

- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária. Dezembro 2009.
Disponível também em: www.conab.gov.br
- CRAVEIRO, K.I.C., JUNIOR, J.E.G., SILVA, M.C.M., MACEDO, L.L.P., LUCENA, W.A., SILVA, M.S., JUNIOR, J.D.A.S., OLIVEIRA, G.R., MAGALHÃES, M.T.Q., SANTIAGO, A.D., GROSSI DE SA, M.F. **Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer.** Journal of Biotechnology, v.145, p.215-221. 2009.
- CROES, E., GEBRUERS, K., LUYTEN, N., DELCOUR, J.A., COURTIN, C.M. **The three classes of wheat xylanase-inhibiting proteins accumulate in an analogous way during wheat ear development and germination.** Journal of Plant Physiology, v.166, p.1253-1262. 2009.
- DAUTOVA M.M., ROZE, E., OVERMARS, H., GRAAFF, L., SCHOTS, A., HELDER, J., GOVERSE, A., BAKKER, J., SMANT, G. **A symbiont-independent endo-1,4-beta-xylanase from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v.19, n.5, p.521-529. 2006.
- DAVIES, G.J., WILSON, K.S., HENRISSAT, B. **Nomenclature for sugarbinding subsites in glycosyl hydrolases.** Biochemical Journal, v.321, p.557– 559. 1997.
- DAVIN, L.B., LEWIS, N.G. **Lignin primary structures and dirigent sites.** Current Opinion in Biotechnology, v.16, p.407-415. 2005.
- DE DUVE, C. **Singularities - Landmarks on the pathways of life.** Cambridge University Press. 1th ed. p.256, 2005.
- DE JONG, A., CORDEWENER, J., LO SCHIAVO, F., TENI, M., VANDEKERCKHOVE, J., VAN KAMRNEN, A. AND DE VRIES, S.C. **A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase.** Plant Cell. v.4, p.425-433. 1992.
- DEBYSER, W., DERDELINCKX, G., DELCOUR, J.A. **Arabinoxylan solubilization and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during mashing with wheat wholemeal adjuncts: evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat.** Journal of the American Society of Brewing Chemists, v.55, p.153– 156. 1997.
- DEININGER, P.L., DANIELS, G.R. **The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements.** Trends in Genetics, v.2, p.76-80. 1986.
- DEISING, H.B., WERNER, S., WERNITZ, M. **The role of fungal appressoria in plant infection.** Microbes and Infection, v.2, n.13, p.1631-41. 2000.
- DESLANDES, J.A. **Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachirhizi* no Estado de Minas Gerais.** Fitopatologia Brasileira, v.4, p.337-339. 1979.
- DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO – Seção 1. ISSN 1677-7042. Nº 57, 2005.
- DICKINSON, M. **Molecular Plant Pathology.** BIOS Scientific Publishers. p. 256. 2003.
- DOE/JOINT GENOME INSTITUTE. **"Soybean Genome Sequenced."** December 2008.
- DURAND, A., HUGHES, R., ROUSSEL, A., FLATMAN, R., HENRISSAT, B., NATHALIE JUGE, N. **Emergence of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18.** FEBS Journal, v.272, p.1745–1755. 2005.
- ECHEVERRI, C.J., BEACHY, P.A., BAUM, B., BOUTROS, M., BUCHHOLZ, F., CHANDA, S.K., DOWNWARD, J., ELLENBERG, J., FRASER, A.G., HACOEN, N., HAHN, W.C., JACKSON,

- A.L., KIGER, A., LINSLEY, P.S., LUM, L., MA, Y., PRÉVÔT, B.M., ROOT, D.E., SABATINI, M., TAIPALE, J., PERRIMON, N., BERNARDS, R. **Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens.** *Nature Methods*, v.3, p.777- 779. 2006.
- EDGER, P.P., J. PIRES, C. **Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes.** *Chromosome Research*, v.17, p.699–717. 2009.
- EFIMTSEV, E.I., BUROV, G.P., VORONINA, O.E. **Specific features of accumulation kinetics of entomocidal exotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp thuringiensis during the fermentation stage of bitoxibacillin production.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.38, p.460-466. 2002.
- ELLIOTT, G.O., HUGHES, R.K., JUGE, N., KROON, P.A., WILLIAMSOM, G. **Functional identification of the cDNA coding for a wheat endo-(1,4)-h-D xylanase inhibitor.** *FEBS Letters*, v.519, p.66– 70. 2002.
- EMBRAPA SOJA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 2000/01.** Embrapa Soja. - Londrina: Embrapa Soja/Fundação MT, p.245, 2000.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja – Região central do Brasil – 2001/2002.** Londrina, p.267, 2001.
- EPPLER, P., APEL, K., BOHLMANN, H. **An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis- related proteins.** *Plant Physiology*, v.109, p.813–820. 1995.
- ESCUADERO, A., MEDIAVILLA, S., HEILMEIER, H. **Leaf longevity and drought: avoidance of the costs and risks of early leaf abscission as inferred from the leaf carbon isotopic composition.** *Functional Plant Biology*, v.35, n.8, p.705-713. 2008.
- ESCUADERO, I.R., ESTELA, A., PORCAR, M., MARTINEZ, C., OGUIZA, J.A., ESCRICHE, B., FERRE, J., CABALLERO, P. **Molecular and Insecticidal Characterization of a CryII Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p.4796–4804. 2006.
- ESPINASSE, S., CHAUFAX, J., BUISSON, C., PERCHAT, S., GOHAR, M., BOURGUET, D., SANCHIS, V. **Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*.** *Current Microbiology*, v.47, p.501–507. 2003.
- FEDERICI, B.A. **Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v.89, p.30–38. 2005.
- FILIPOV, N.M., LAWRENCE, D.A. **Developmental toxicity of a triazole fungicide: consideration of interorgan communication.** *Toxicological Sciences*, v.62, p.185–186. 2001.
- FITCHES, E., EDWARDS, M.G., MEEB, C., GRISHIN, E., GATEHOUSE, A.M.R., EDWARDS, J.P., GATEHOUSE, J.A. **Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion.** *Journal of Insect Physiology*, v.50, p.61–71. 2004 (a).
- FITCHES, E., PHILIP, J., HINCHLIFFE, G., VERCRUYSSSE, L., CHOUGULE, N., GATEHOUSE, J.A. **An evaluation of garlic lectin as an alternative carrier domain for insecticidal fusion proteins.** *Insect Science*, v.15, p.483-495. 2008.

- FITCHES, E., WILKINSON, H., BELL, H., BOWN, D.P., GATEHOUSE, J.A., EDWARDS, J.P. **Cloning, expression and functional characterisation of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect Chitinase.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.34, p.1037–1050. 2004 (b).
- FLATMAN, R., MCLAUCHLAN, W.R., JUGE, N., FURNISS, C., BERRIN, J.G., HUGHES, R.K., MANZANARES, P., LADBURY, J.E., O'BRIEN, R., WILLIAMSON, G. **Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein XIP-I from wheat.** *Biochemical Journal*, v.365, p.773–781. 2002.
- FLOWERS, T.J., COLMER, T.D. **Salinity tolerance in halophytes.** *New Phytologist*, v.179, p.945–963. 2008.
- FRANKENHUYZEN, V. **Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v.101, p.1–16. 2009.
- FRISVOLD, G.B., REEVES, J.M. **The costs and benefits of refuge requirements: The case of Bt cotton.** *Ecological Economics*, v.65, p.87–97. 2008.
- FURNISS, C.S.M., BELSHAW, N.J., ALCOCER, M.J.C., WILLIAMSON, G., ELLIOTT, G.O., GEBRUERS, K., HAIGH, N.P., FISH, N.M., KROON, P.A. **A family 11 xylanase from *Penicillium funiculosum* is strongly inhibited by three wheat xylanase inhibitors.** *Biochimica and Biophysica Acta*, v.1598, p.24–29. 2002.
- GAI, J. **Soybean Breeding.** In: J. Gai (Ed.), *Plant Breeding: Crop Species*. China Agriculture Press, Beijing, pp. 207–251. 1997.
- GARCIA-OLMEDO, F., MOLINA, A., SEGURA, A., MORENO, M. **The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants.** *Trends in Microbiology*, v.3, p.72–74. 1995.
- GATEHOUSE, J.A. **Biotechnological prospects for engineering insect-resistance plants.** *Plant Physiology*, v.146, p.881–887. 2008.
- GHEYSARI, M., MIRIATIFI, S.M., BANNAYAN, M., HOMAEE, M., HOOGENBOOM, G. **Interaction of water and nitrogen on maize grown for silage.** *Agricultural Water Management*, v.96, n.5, p.809–821. 2009.
- GIJSEGEM, F.V., SOMSSICH, I.E., SCHEEL, D. **Activation of defense-related genes in parsley leaves by infection with *Erwinia chrysanthemi*.** *European Journal of Plant Pathology*, v.101, p.549–559. 1995.
- GOELLNER, K., LOEHRER, M., LANGENBACH, C., UWE CONRATH, U., KOCH, E., SCHAFFRATH, U. ***Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust.** *Molecular Plant Pathology*, v.11, p.169–177. 2010.
- GREEN, T.R., RYAN, C.A. **Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects.** *Science*, v.175, p.776–777. 1972.
- GROSSI DE SÁ, M. F., GIBAND, M. **As Plantas Transgênicas no Mundo.** In: Moresco, E. *Algodão – Pesquisa e Resultados para o Campo*. Fundo de Apoio a Cultura do Algodão, Cuiabá, MT, pp. 287–303, 2006.
- GROSSI DE SÁ, M.F. **Composições e métodos para modificar a expressão de genes usando o promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de plantas de algodoeiro.** Patent

- Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. INPI 012070000116; EU 08002062.1-1212, 2008.
- GROSSI DE SÁ, M.F., MAGALHÃES, M.T.Q., SILVA, M.S., SILVA, S.M.B., DIAS, S.C., NAKASU, E.Y.T., BRUNETTA, P.S.F., OLIVEIRA, G.R., OLIVEIRA-NETO, O.B., SOARES, L.H.B., AYUB, M.A.Z., SIQUEIRA, H.A., FIGUEIRA, E.L.Z. **Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a CryIIa-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v.40, p.773-782. 2007.
- GROSSI-DE-SÁ, M.F., FIGUEIRA, E.L.Z., DEL SARTO, R.P., OLIVEIRA NETO, O.B., OLIVEIRA, G.R., BRUNETTA, P., SILVA, M.C.M. **Molecular evolution of alpha-amylase inhibitor: Screening for cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*.** The FEBs Journal, v.272, p.511-511. 2005.
- GULEN, H., CANSEV, A., ERIS, A. **Cold hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of soluble sugars and phospholipids.** Journal of Agricultural Science, v.147, p.459-467. 2009.
- HAGEL, J.M., YEUNG E.C., FACCHINI, P.J. **Got milk? The secret life of laticifers.** Trends in Plant Science, v.13, n.12, p.631-639. 2008.
- HALPIN, C. **Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology.** Plant Biotechnology Journal, v.3, p.141–155. 2005.
- HANNON, G.J. **RNA interference.** Nature, v.418, p.244-251. 2002.
- HATSCH, D., PHALIP, V., PETKOVSKI, E., JELTSCH, J.M. ***Fusarium graminearum* on plant cell wall: No fewer than 30 xylanase genes transcribed.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v.345, p.959–966. 2006.
- HEITZ, T., SEGOND, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., PRASAD, V., BRUNNER, F., FRITIG, B., LEGRAND, M. **Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis-related (PR) protein - a new plant chitinase/lysozyme.** Molecular & General Genetics, v.245, n.2, p.246-254. 1994.
- HENNIG, M., JANSONIUS, J.N., VAN SCHELTINGA, A.C.T., DIJKSTRA, B.W., SCHLESIER, B. **Crystal structure of Concanavalin B at 1.65 Å resolution. An “inactivated” chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*.** Journal of Molecular Biology, v.254, p.237–246. 1995.
- HIMMEL, M.E., DING, S.Y., JOHNSON, D.K., ADNEY, W.S., NIMLOS, M.R., BRADY, J.W., FOUST, T.D. **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production.** Science, v.315, p.804-807. 2007.
- HOEFLE, C., LOEHRER, M., SCHAFFRATH, U., FRANK, M., SCHULTHEISS, H., HUKELHOVEN, R. **Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley.** Phytopathology, v.99, n.3, p.220-226. 2009.
- HÖFTE, H., WHITELEY, H.R. **Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.** Microbiological Reviews, v.53, p.242–255. 1989.

- HUA, J. **From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants.** *Current Opinion in Plant Biology*, v.12, p.568–573. 2009.
- IGAWA, T., OCHIAI-FUKUDA, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S., SHIBATA, T., YAMAGUCHI, I., KIMURA, M. **New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat.** *Plant Cell Physiology*, v.45, p.1347–1360. 2004.
- IGAWA, T., TOKAI, T., KUDO, T., YAMAGUCHI, I., KIMURA, M. **A wheat xylanase inhibitor gene, Xip-I, but not Taxi-I, is significantly induced by biotic and abiotic signals that trigger plant defense.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.69, n.5, p.1058-1063. 2005.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. <http://www.ico.org>. Trade Statistics, 2008.
- ITO, K., TANAKAMARU, K., MORITA, S., ABE, J., INANAGA, S. **Lateral root development, including responses to soil drying, of maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*) seminal roots.** *Physiologia Plantarum*, v.127, n.2, p.260-267. 2006.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops.** ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Executive summary, brief 39, 2008.
- JARVIS, M.C. **Plant cell walls: supramolecular assembly, signalling and stress.** *Structural Chemistry*, v.20, p.245–253. 2009.
- JETTER, R., KUNST, L., SAMUELS, A.L. **Composition of plant cuticular waxes.** in: M. Riederer, C. Müller (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle*, vol. 23, Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom, pp. 145–181. 2006,
- JUGE, N. **Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes.** *Trends in Plant Science*, v.11, n.7, p.359-367. 2006.
- JUGE, N., PAYANC, F., WILLIAMSON, G. **XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function.** *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, v.1696, p.203–211. 2004.
- KANAZAWA, A. **RNA silencing manifested as visibly altered phenotypes in plants.** *Plant Biotechnology*, v.25, p.423–435. 2008.
- KASPRZEWSKA, A. **Plant chitinases – Regulation and function.** *Cellular & Molecular Biology Letters*, v.8, p.809 – 824. 2003.
- KHAN, S.N., SIMS, P.F.G. **Molecular characterization of two endo-1,4-beta-xylanase genes from *Phanerochaete chrysosporium*.** *Bangladesh Journal of Botany*, v.34, n.2, p.101-108. 2005.
- KHANDKE, K.M., VITHAYATHIL, P.J., MURTHY, S.K. **Purification of xylanase, b-glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.274, p.491–500. 1989.
- KIM, K.S., PARK, S.H., JENKS, M.A. **Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit.** *Journal of Plant Physiology*, v.164, n.9, p.1134-1143. 2007.
- KLEINE, T., MAIER, U.G., LEISTER, D. **DNA Transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis.** *Annual Review of Plant Biology*, v.60, p.115–318. 2009.
- KÖLLER, W., YAO, C.L., TRIAL, F., PARKER, D.M. **Role of cutinase in the invasion of plants.** *Canadian Journal of Botany*, v.73, p.S1109-S1118. 1995.

- KOMATSU, S., WADA, T., ABALEA, Y., NOURI, M.Z., NANJO, Y., NAKAYAMA, N., SHIMAMURA, S., YAMAMOTO, R., NAKAMURA, T., FURUKAWA, K. **Analysis of plasma membrane proteome in soybean and application to flooding stress response.** Journal of Proteome Research, v.8, n.10 p.4487-4499. 2009.
- KONG, L., WANG, F., SI, J., FENG, B., LI, S. **Water-soluble phenolic compounds in the coat control germination and peroxidase reactivation in *Triticum aestivum* seeds.** Plant Growth Regulation, v.56, p.275–283. 2008.
- KOSZUL, R., CABURET, S., DUJON, B., FISCHER, G. **Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments.** Embo Journal, v.23, n.1, p.234-243. 2004.
- KUMUDINI, S., PRIOR, E., OMIELAN, J., TOLLENAAR, M. **Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption.** Crop Science, v.48, n.6, p.2343-2350. 2008.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v.227, p.680–685. 1970.
- LAGRIMINI, L.M., BURKHART, W., MOYER, M., ROTHSTEIN, S. **Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression.** Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. v.84, p.7542–7546. 1987.
- LALL, N., NIKOLOVA, R.V., BOSA, A.J.N. **Changes in activities of superoxide dismutase peroxidase and catalase from leaves of *Impatiens flanaganiae* in response to light intensity.** South African Journal of Botany, v.65, n.4, p.255-259. 1999.
- LASKOWSKI, R.A., MACARTHUR, M.W., MOSS, D.S., THORNTON, J.M., **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.** Journal of Applied Crystallography, v.26, p.283-291. 1993.
- LAURIANO, J.A., RAMALHO, J.C., LIDON, F.C., MATOS, M.D. **Mechanisms of energy dissipation in peanut under water stress.** Photosynthetica, v.44, n.3, p.404-410. 2006.
- LEE, M.K., ILES, P., HEN, J.S. **Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* VIP3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v.339, p.1043–1047. 2006.
- LEE, M.K., WALTERS, F.S., HART, H., PALEKAR, N., CHEN, J.S. **Mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin.** Applied and Environmental Microbiology, v.69, p.4648-4657. 2003.
- LI, D.H., ASHBY, A.M., JOHNSTONE, K. **Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v.16, n.6, p.545-552. 2003.
- LI, Z., NELSON, R. L. **Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs.** Crop Science, v.41, p.1337–1347. 2001.

- LO, Y.C., SARATALE, G.D., CHEN, W.M., BAI, M.D., CHANG, J.S. **Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production.** Enzyme and Microbial Technology, v.44, p.417–425. 2009.
- LUCIA, A., LICASTRO, S., ZERBA, E., AUDINO, P.G., MASUH, H. **Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils.** Bioresource Technology, v.100, n.23, p.6083-6087. 2009.
- MAAGD, R.A., BRAVO, A., BERRY, C., CRICKMORE, N., SCHNEPF, H.E. **Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria.** Annual Review on Genetics, v.37, p.409–33. 2003.
- MAGALHÃES, M.T.Q., VASCONCELOS, E.A.R., SILVA, T.S., FRAGOSO, R.R., SILVA, S.M.B., SAMPAIO, R.O., OLIVEIRA-NETO, O.B., BATISTA, J.A.N., GROSSI DE SÁ, M.F. **Toxin profile from a *Bacillus thuringiensis* strain active towards Lepidoptera and Coleoptera insect pests.** Archives of Microbiology. Em preparação.
- MAHESHWARI, R., BHARADWAJ, G., BHAT, M.K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.64, n.3, p.461–488. 2000.
- MALUF, M.P., DA SILVA, C.C., DE OLIVEIRA, M.D.A., TAVARES, A.G., SILVAROLLA, M.B., GUERREIRO, O. **Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica*.** Genetics and Molecular Biology, v.32, n.4, p.802-810. 2009.
- MARTIN, D., THOLL, D., GERSHENZON, J., BOHLMANN, J. **Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of norway spruce stems.** Plant Physiology, v.129, p.1003–1018. 2002.
- MARTINS, E.S., PRAÇA, L.B., DUMAS, V.F., SILVA-WERNECK, SONE, E.H., WAGA, I.C., BERRY, C., MONNERAT, R.G. **Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*).** Biological Control, v.40, p.65-68. 2007.
- MARUTHASALAM, S., KALPANA, K., KUMAR, K.K., LOGANATHAN, M., POOVANNAN, K., RAJA, J.A.J., KOKILADEVI, E., SAMIYAPPAN, R., SUDHAKAR, D., BALASUBRAMANIAN, P. **Pyramiding transgenic resistance in elite indica rice cultivars against the sheath blight and bacterial blight.** Plant Cell Reports, v.26, p.791–804. 2007.
- MATERA, A.G., TERNS, R.M., TERNS, M.P. **Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs.** Nature Reviews | Molecular Cell Biology, v.8, p.209-220. 2007.
- MCLAUCHLAN, W.R., GARCIA-CONESA, M.T., WILLIAMSON, G., ROZA, M., RAVESTEIN, P., MAAT, J. **A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases.** Biochemical Journal, v.338, p.441-446. 1999.
- MELCHERS, L.S., GROOT, M.A., VAN DER KNAAP, J., PONSTEIN, A.S., BUURLAGE, M.B.S., BOL, J.F., CORNELISSEN, B.J.C., VAN DEN ELZEN, P.J.M., LINTHORST, H.J.M. **A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity.** Plant Journal, v.5, p.469–480. 1994.
- MESQUITA, C.M., COSTA, N.P., MANTOVANI, E.C., ANDRADE, J.C.M.A., FRANÇA-NETO, J.B., SIVA, J.G., FONSECA, J.R., PORTUGAL, F.A.F., SOBRINHO, J.B.G. **Manual do produtor:**

- como evitar desperdício nas colheitas de soja, do milho e do arroz. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 31p. 1998.
- MÉTRAUX, J.P., STREIT, L., STAUB, T. **A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.33, p.1–9. 1988.
- MISAS-VILLAMIL, J.C., VAN DER HOORN, R.A. **Enzyme–inhibitor interactions at the plant–pathogen interface.** *Current Opinion in Plant Biology*, v.11, p.380–388. 2008.
- MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil.** Campinas: ITAL, 1062p. 1981.
- MOELLER, D.A., TIFFIN, P. **Genetic diversity and the evolutionary history of plant immunity genes in two species of zea.** *Molecular Biology and Evolution*, v.22, n.12, p.2480–2490. 2005.
- MORTEL, M., RECKNOR, J.C., GRAHAM, M.A., NETTLETON, D., DITTMAN, J.D., NELSON, R.T., GODOY, C.V., ABDELNOOR, R.V., ALMEIDA, A.M.R., BAUM, T.J., WHITHAM, S.A. **Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.20, p.887–99. 2007.
- NEIMAN, M., OLSON, M.S., TIFFIN, P. **Selective histories of poplar protease inhibitors: elevated polymorphism, purifying selection, and positive selection driving divergence of recent duplicates.** *New Phytologist*, v.183, p.740–750. 2009.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger – Principles of Biochemistry.** Freeman. 5th ed. 1158p. 2008.
- NEVES, J.S. **Influência da aplicação de fosfite de potássio na severidade da Ferrugem asiática da soja.** Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília. 2006.
- NEWELL, C.A., HYMOWITZ, T. **Hybridization in the genus *glycine* subgenus *glycine* willd. (Leguminosae, papilionoideae).** *American Journal of Botany*, v.70, p.334–348. 1983.
- NUSSBAUM, R.L., MCINNES, R.R., WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson - Genética Médica.** Elsevier. 7th ed. 501p. 2008.
- OCHOA-ACUNA, H.G., BIALKOWSKI, W., YALE, G., HAHN, L. **Toxicity of soybean rust fungicides to freshwater algae and *Daphnia magna*.** *Ecotoxicology*, v.18, n.4, p.440-446. 2009.
- OKUSHIMA, Y., KOIZUMI, N., KUSANO, T., SANO, H. **Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins.** *Plant Molecular Biology*, v.42 p.479–488. 2000.
- OLIVEIRA, G.R., **Evolução in vitro de moléculas Cry ativas contra *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brasil. 2008.
- OLOKA, H.K., TUKAMUHABWA, P., SENGOOBA, T., ADIPALA, E., KABAYI, P. **Potential for soybean rust tolerance among elite soybean lines in Uganda.** *Crop Protection*, v.28, p.1076–1080. 2009.
- ORGEL, L. **Oringin of Life. A simpler nucleic acid.** *Science*, v.290, p.1306-1307. 2000.
- PANTHEE, D.R., YUAN, J.S., WRIGHT, D.L., MAROIS, J.J., MAILHOT, D., STEWART, JR. C.N. **Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage.** *Functional & Integrative Genomics*, v.7, p.291–301. 2007.

- PAPA, G. **Pragas e seu controle**. Em: Algodão – Pesquisa e Resultados para o Campo. Fundo de Apoio a Cultura do Algodão, FACUAL. 392p. 2006.
- PAPANIKOLAOU, Y., PRAG, G., TAVLAS, G., VORGIAS, C.E., OPPENHEIM, A.B., PETRATOS, K. **High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis**. *Biochemistry*, v.40, p.11338-11343. 2001.
- PASSARINHO, P.A., VAN HENGEL, A.J., FRANZ, P.F., DE VRIES, S.C. **Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene**. *Planta*, v.212, n.4, p.556-567. 2001.
- PAYAN, F., FLATMAN, R., PORCIERO, S., WILLIAMSON, G., JUGE, N., ROUSSEL, A., **Structural analysis of XIP-I, a xylanase proteinaceous inhibitor from wheat**. *Biochemical Journal*, v.372, p.399–405. 2003.
- PAYAN, F., LEONE, P., FURNISS, C., TAHIR, T.A., DURAND, A., PORCIERO, S., MANZANARES, P., WILLIAMSON, G., GILBERT, H., JUGE, N., ROUSSEL, A. **The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-I – structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases**. *Journal of Biological Chemistry*, v.279, p.36029–36027. 2004.
- PEARCE, R.S. **Plant freezing and damage**. *Annals of Botany*, v.87, n.4, p.417-424. 2001.
- PEDRAS, M.S.C., CHUMALA, P.B., JIN, W., ISLAM, M.S., HAUCK, D.W. **The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: phytotoxin production and phytoalexin elicitation**. *Phytochemistry*, v.70, n.3, p.394-402. 2009.
- PINTO, J.J.R., YEPHREMOV, A. **Surface lipids and plant defenses**. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.47, p.540–549. 2009.
- POLLARD, M., BEISSON, F., LI, Y., OHLROGGE, J.B. **Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin**. *Trends in Plant Science*, v.13, p.236-246. 2008.
- POLLET, A., BELIËN, T., FIERENS, K., DELCOUR, J.A., COURTIN, C. ***Fusarium graminearum* xylanases show different functional stabilities, substrate specificities and inhibition sensitivities**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.44, p.189–195. 2009.
- PONSTEIN, A.S., VLOEMANS, S.A.B., BUURLAGE, M.B.S., VAN DEN ELZEN, P.J.M., MELCHERS, L.S., CORNELISSEN B.J.C. **A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity**. *Plant Physiology*, v.104, p.109-118. 1994.
- PRABHU, K.A., MAHESHWARI, R. **Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and their action on plant cell walls**. *Journal of Biosciences*, v.24, p.461–470. 1999.
- PRIOLLI, R.H.G., MAZZAFERA, P., SIQUEIRA, W.J., MOLLER, M., ZUCCHI, M.I., RAMOS, L.C.S., GALLO, P.B., COLOMBO, C.A. **Caffeine inheritance in interspecific hybrids of *Coffea arabica* x *Coffea canephora* (Gentianales, Rubiaceae)**. *Genetics and Molecular Biology*, v.31, n.2, p.498-504. 2008.
- QUECINI, V., ZUCCHI, M.I., BALDIN, J., VELLO, N.A. **Identification of soybean genes involved in circadian clock mechanism and photoperiodic control of flowering time by In silico analyses**. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.49, n.11, p.1640-1653. 2007.

- QUECINI, V., ZUCCHI, M.I., PINHEIRO, J.B., VELLO, N.A. **In silico analysis of candidate genes involved in light sensing and signal transduction pathways in soybean.** Plant Biotechnology Reports, v.2, n.1, p.59-73. 2008.
- RAISON, J.K., PIKE, C.S., BERRY, J.A. **Growth temperature-induced alterations in the thermotropic properties of *Nerium oleander* membrane-lipids.** Plant Physiology, v.70, n.1, p.215-218. 1982.
- RAO, I.M., SHARP, R.E., BOYER, J.S. **Leaf magnesium alters photosynthetic response to low water potentials in sunflower.** Plant Physiology, v.84, p.1214-1219. 1987.
- RASKO, D.A., ALTHERR, M.R., HAN, C.S., RAVEL, J. **Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms.** FEMS Microbiology Reviews, v.29, p.303–329. 2005.
- RASMUSSEN, U., BOJSEN, K., COLLINGE, D.B. **Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*.** Plant Molecular Biology, v.20, p.277-287. 1992.
- REGEV, A., KELLER, M., STRIZHOV, N., SNEH, B., PRUDOVSKY, E., CHET, I., GINZBERG, I., KONCZ-KALMAN, Z., KONCZ, C., SCHELL, J., ZILBERSTEIN, A. **Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae.** Applied and Environmental Microbiology, v.62, p.3581–3586. 1996.
- RIVERA, A.F., BENINTENDE, G., COZZI, J., AGUIRRE, V.M.B., ALARCON, J.J.V., MEZA, J.E.L. **Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina.** Antonie Van Leeuwenhoek, v.86, p.87–92. 2004.
- ROKNEY, A., KOBILER, O., AMIR, A., COURT, D.L., STAVANS, J., ADHYA, S., OPPENHEIM, A.B. **Host responses influence on the induction of lambda prophage.** Molecular Microbiology, v.68, n. 1, p.29–36. 2008.
- RON, M., AVNI, A. **The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato.** Plant Cell, v.16, p.1604–1615. 2004.
- ROSENFELD, J., CAPDEVIELLE, J., GUILLEMOT, J.C., FERRARA, P. **In-gel digestion of proteins for internal sequence-analysis after 1-dimensional or 2-dimensional gel-electrophoresis.** Analytical Biochemistry, v.203, p.173-179. 1992.
- ROUAU, X., SURGET, A. **Evidence for the presence of a pentosanase inhibitor in wheat flours.** Journal of Cereal Science, v.28, p.63– 70. 1998.
- RYERSE, J.S., PURCELL, J.P., SAMMONS, R.D. **Structure and formation of the peritrophic membrane in the larva of the southern corn rootworm, *diabrotica undecimpunctata*.** Tissue and Cell, v.26, n.3, p.431-437. 1994.
- SALLES, B.C., CUNHA, R.B., FONTES, W., SOUSA, M.V., FILHO, E.X.F. **Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*.** Journal of Biotechnology, v.81, p.199–204. 2000.
- SALVAUDON, L., GIRAUD, T., SHYKOFF, J.A. **Genetic diversity in natural populations: a fundamental component of plant–microbe interactions.** Current Opinion in Plant Biology, v.11, p.135–143. 2008.
- SAMPSON, M.N., GOODAY, G.W. **Involvement of chitinase of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects.** Microbiology, v.144, p.2189-2194. 1998.

- SANTINI, C.F., CAPT, A., BARS, R., PALLÉN, C., ROUQUIE, D., GUICHENEY, C.H. **Evaluation of soybean endogenous allergens by proteomics approach - development and optimization of the method.** *Allergy*, v.63, p.340-341. 2008.
- SARRAFZADEH, M.H., GUIRAUD, J.P., LAGNEAU, C., GAVEN, B., CARRON, A., NAVARRO, J.M. **Growth, sporulation, δ -endotoxins synthesis, and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14.** *Current Microbiology*, v.51, pp.75–81. 2005.
- SAUER, J.D. **Historical geography of crop plants - a select roster.** CRC Press, Boca Raton, Florida. 1993.
- SCHELTINGA, A.C.T., ARMAND, S., KALK, A., ISOGAI, K.H., HENRISSAT, B., DIJKSTRA, B.W. **Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: Evidence for substrate assisted catalysis.** *Biochemistry*, v.34, p.15619–15623. 1995.
- SCHELTINGA, A.C.T., HENNIG, M., DIJKSTRA, B.W. **The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18.** *Journal of Molecular Biology*, v.262, p.243–257. 1996.
- SCHELTINGA, A.C.T., KALK, K.H., BEINTEMA, J.J., DIJKSTRA, B.W. **Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor.** *Structure*, v.2, p.1181–1189. 1994.
- SCHERM, H., CHRISTIANO, R.S.C., ESKER, P.D., DEL PONTE, E.M., GODOY, C.V. **Quantitative review of fungicide efficacy trials for managing soybean rust in Brazil.** *Crop Protection*, v.28, p.774–782. 2009.
- SCHMID, R., BERNHARDT, J., ANTELMANN, H., VOLKER, A., MACH, H., VOLKER, U., HECKER, M. **Identification of vegetative proteins for a two-dimensional protein index of *Bacillus subtilis*.** *Microbiology*, v.143, p.991-998. 1997.
- SCHMUTZ, J., CANNON, S.B., SCHLUETER, J., MA, J., MITROS, T., NELSON, W., HYTEN, D.L., SONG, Q., THELEN, J.J., CHENG, J., XU, D., HELLSTEN, U., MAY, G.D., YU, Y., SAKURAI, T., UMEZAWA, T., BHATTACHARYYA, M.K., SANDHU, D., VALLIYODAN, B., LINDQUIST, E., PETO, M., GRANT, D., SHU, S., GOODSTEIN, D., BARRY, K., FUTRELL-GRIGGS, M., ABERNATHY, B., DU, J., TIAN, Z., ZHU, L., GILL, N., JOSHI, T., LIBAULT, M., SETHURAMAN, A., ZHANG, X.C., SHINOZAKI, K., NGUYEN, H.T., WING, R.A., CREGAN, P., SPECHT, J., GRIMWOOD, J., ROKHSAR, D., STACEY, G., SHOEMAKER, R.C., JACKSON, S.A. **Genome sequence of the palaeopolyploid soybean.** *Nature*, v.463, p.178-183. 2010.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECULUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, R.D., DEAN, H.D. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, p.775–806. 1998.
- SEBANEK, J. **Plant Physiology.** Amsterdam ; New York : Elsevier, 453p. 1992.
- SELS, J., MATHYS, J., CONINCK, B.M.A., CAMMUE, B.P.A., BOLLE, M.F.C. **Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v.46, p.941–950. 2008.

- SEZEN, K., MURATOGLU, H., NALCACIOGLU, R., MERT, D., DEMIRBAG, Z., KATI, H. **Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis from european shot-hole borer, *Xyleborus dispar* (Coleoptera : Scolytidae).** New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, v.36, p.77-84. 2008.
- SHIMONO, K., MATSUDA, H., KAWAMUKAI, M. **Functional expression of chitinase and chitosanase, and their effects on morphologies in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** Bioscience Biotechnology And Biochemistry, v.66, n.5, p.1143-1147. 2002.
- SHIRONG, A. **Transgenic Cotton.** Science Press, 2004.
- SILVERSTEIN, K.A.T., GRAHAM, M.A., PAAPE, T.D., VANDENBOSCH, K.A. **Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*.** Plant Physiology, v.138, p.600–610. 2005.
- SINCLAIR, J.B., HARTMAN, G.L. **Soybean Rust.** In: Hartman, G.L., Sinclair, J.B., Rupe, J.C. (Ed.). Compendium of soybean disease. 4ed. S. Paul: American Phytopathological Society, p.25-26. 1999.
- SINGH, A., KIRUBAKARAN, S. I., SAKTHIVEL, N. **Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat.** Protein Expression and Purification, v.56, p.100–109. 2007.
- SINGH, R.J., JAUHR, P. **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: Oilseed Crops.** v.4, CRC Press, 1th ed. 376p. 2005.
- SKAMNIOTI, P., GURR, S.J. ***Magnaporthe grisea* cutinase mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence.** Plant Cell, v.19, n.8, p.2674-2689. 2007.
- SMALL, I. **RNAi for revealing and engineering plant gene functions.** Current Opinion in Biotechnology, v.18, p.148–153. 2007.
- SMIRNOFF, W.A. **Experimental confirmation of pathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* and chitinase complex with respect to *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera, Tortricidae), insect pest of spruce.** Canadian Entomologist. V.109, p.351-358. 1977.
- SOARES, R.M. **Balanço da Ferrugem asiática na safra 2006-07 com base nos números do sistema de alerta.** Em: Anais do Simpósio brasileiro de Ferrugem asiática da soja. Londrina: Embrapa Soja. 131p. 2007.
- SOMSSICH, I.E., SCHMELZER, E., BOLLMANN, J., HAHLBROCK, K. **Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells.** Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., v.83, p.2427–2430. 1986.
- SOUZA, C.R., MAROCO, J.P., SANTOS, T.P., RODRIGUES, M.L., LOPES, C., PEREIRA, J.S., CHAVES, M.M. **Control of stomatal aperture and carbon uptake by deficit irrigation in two grapevine cultivars.** Agriculture Ecosystems & Environment, v.106, n.2-3, p.261-274. 2005.
- SOUZA, E.S.C., VASCONCELOS, E.A.R., GATEHOUSE, J.A., SILVA, M.S., GROSSI DE SÁ, M.F. **Clonagem, expressão e purificação de uma nova defensina de café (*Coffea arabica*) (CD1) e sua atividade contra o fungo fitopatogênico (*Fusarium solani*).** Anais Talento Estudantil, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009.
- SPIRIN, A.S. **The RNA World and Its Evolution.** Molecular Biology, v.39, n.4, p.466–472. 2005.

- STEC, B. **Plant thionins – the structural perspective.** Cellular and Molecular Life Science, v.63, p.1370–1385. 2006.
- STEMMER, P.C. **DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution.** Proceedings of the National Academy of Science U.S.A, v.91, p.10747-10751. 1994.
- SUZUKAWA, K., YAMAGAMI, T., OHNUMA, T., HIRAKAWA, H., KUHARA, S., ASO, Y., ISHIGURO, M. **Mutational analysis of amino acid residues involved in catalytic activity of a family 18 chitinase from Tulip Bulbs.** Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v.67, p.341-346. 2003.
- TADA, Y., KASHIMURA, T. **Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza*.** Plant and Cell Physiology, v.50, n.3, p.439-446. 2009.
- TAIRA, T., HAYASHI, H., TAJIRI, Y., ONAGA, S., UECHI, G., IWASAKI, H., OHNUMA, T., FUKAMIZO, T. **A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): Biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification.** Glycobiology, v.19, n.12, p.1452–1461. 2009.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology.** The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 559p. 1991.
- TANFOUS, N.G.B., KALLEL, H., JARBOUI, M.A., FATHALLAH, D.M. **Expression in *Pichia pastoris* of a recombinant scFv form of MAb 107, an anti human CD11b integrin antibody.** Enzyme and Microbial Technology, v.38 p.636–642. 2006.
- TERRAS, F.R., EGGERMONT, K., KOVALEVA, V., RAIKHEL, N.V., OSBORN, R.W., KESTER, A., REES, S.B., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B.P., BROEKAERT, W.F. **Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense.** Plant Cell, v.7, p.573–588. 1995.
- THOMAS, W.E., ELLAR, D.J. **Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var israelensis insecticidal delta-endotoxin.** FEBS Letters, v.154, p.362-368. 1983.
- THOMPSON, J.A., NELSON, R.L. **Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean.** Crop Science, v.38, p.1356–1362. 1998.
- TOKUNAGA, T., ESAKA, M. **Induction of a novel XIP-type xylanase inhibitor by external ascorbic acid treatment and differential expression of XIP-family genes in rice.** Plant Cell Physiology, v.48, p.700–714. 2007.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. AND GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications.** Proceedings of the National Academy of Science, v.76, p.4350-4354. 1979.
- TREMBLAY, A., LI, S., SCHEFFLER, B.E., MATTHEWS B.F. **Laser capture microdissection and expressed sequence tag analysis of uredinia formed by *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust.** Physiological and Molecular Plant Pathology, v.73, p.163–174. 2009.
- TRUNG, N.P., FITCHES, E., GATEHOUSE, J.A. **A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects.** BMC Biotechnology, v.6, artigo n.18. 2006.

- TSCHANZ, A.T. **Soybean rust epidemiology: Final report.** Shanhai, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, 157p. 1982.
- UBHAYASEKERA, W., RAWAT, R., HO, S.W.T.H., WIWEGER, M., ARNOLD, S., CHYE, M.L., MOWBRAY, S.L. **The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from *Norway spruce*.** *Plant Molecular Biology*, v.71, p.277–289. 2009.
- USDA - U.S. Department of Agriculture, **Agricultural Research Service, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN).** [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, MD. Available: <http://www.ars-grin.gov/var/apache/cgi-bin/npgs/html/> (01 February 2007).
- VAN LOON, L.C. **Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection.** in: R.K.S. Wood (Ed.), *Active Defense Mechanisms in Plants*, Plenum Press, New York, p.247–273. 1982.
- VAN LOON, L.C., VAN STRIEN E.A. **The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.55, p.85-97. 1999.
- VASCONCELOS, E.A.R., NOGUEIRA, F.C.S., ABREU, E.F.M., GONÇALVES, E.F., SOUZA, P.A.S., CAMPOS. F.A.P. **Protein extraction from cowpea tissues for 2-D gel electrophoresis and MS analysis.** *Chromatographia*, v.62, p.447-450. 2005.
- VASCONCELOS, E.A.R., SANTANA, C.G., GODOY, C.V., SEIXAS, C.D.S., MOREIRA, L.R.S., MILANEZI, N.G., OLIVEIRA-NETO, O.B., PRICE, D., FITCHES, E., FILHO, E.X.F., SILVA, M.S., MEHTA, A., GATEHOUSE, J.A., GROSSI-DE-SA. M.F. **A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) arresting Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination.** *BMC Biotechnology*. 2011 (aceito para publicação).
- VERA, P., CONEJERO, V. **Pathogenesis-related proteins of tomato P-69 as na alkaline endoproteinase.** *Plant Physiology*, v.87, p.58–63, 1988.
- VIEIRA, L. G. E., ANDRADE, A. C., COLOMBO, C. A., MORAES, A. H. A., MEHTA, A., OLIVEIRA, A. C., LABATE, C. A., MARINO, C. L., VITORELLO, C. B. M., MONTE, D. C., GIGLIOTI, E., KIMURA, E. T., ROMANO, E., KURAMAE, E. E., LEMOS, E. G. M., ALMEIDA, E. R. P., JORGE, E. C., ALBUQUERQUE, E. V. S., SILVA, F. R., VINECKY, F., SAWAZAKI, H. E., DORRY, H. F. A., CARRER, H., ABREU, I. N., BATISTA, J. A. N., TEIXEIRA, J. B., KITAJIMA, J. P., XAVIER, K. G., LIMA, L. M., CAMARGO, L. E. A., PEREIRA, L. F. P., COUTINHO, L. L., LEMOS, M. V. F., ROMANO, M. R., MACHADO, M. A., COSTA, M. M. C., SÁ, M. F. G., GOLDMAN, M. H. S., FERRO, M. I. T., TINOCO, M. L. P., OLIVEIRA, M. C., SLUYS, M. A. V., SHIMIZU, M. M., MALUF, M. P, EIRA, M. T. S., FILHO, O. G., ARRUDA, P., MAZZAFERA, P., MARIANI, P. D. S. C., OLIVEIRA, R. L. B. C., HARAKAVA, R., BALBAO, S. F., TSAI, S. M., MAURO, S. M. Z., SANTOS, S. N., SIQUEIRA, W. J., COSTA, G. G. L., FORMIGHIERI, E. F., CARAZZOLLE, M. F., PEREIRA, G. A. G. **Brazilian Coffee Genome Project: An Est-Based Genomic Resource.** *Brazilina Journal of Plant Physiology*, v.18, p.95-108. 2006.

- VILARINO, M.D., RAVETTA, D.A. **Tolerance to herbivory in lupin genotypes with different alkaloid concentration: Interspecific differences between *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L.** Environmental and Experimental Botany, v.63, n.1-3, p.130-136. 2008.
- VISWANATHAN, C., KHANNACHOPRA, R. **Heat shock proteins - Role in thermotolerance of crop plants.** Current Science, v.71, n.4, p.275-284, 1996.
- VOEGELE, R.T., MENDGEN, K. **Rust haustoria: nutrient uptake and beyond.** New Phytologist, v.159, p.93–100. 2003.
- WANG, P., GRANADOS, R.R.. **Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential pm target sites for insect control.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.47, p110–118. 2001.
- WEI, H., XU, Q., TAYLOR, L.E., BAKER, J.O., TUCKER, M.P., DING, S.Y. **Natural paradigms of plant cell wall degradation.** Current Opinion in Biotechnology. v.20, p.330-338. 2009.
- WEI, H., XU, Q., TAYLOR, L.E., BAKER, J.O., TUCKER, M.P., HYMOWITZ, T., HARLAN, J.R. **Introduction of soybean to North America by Samuel Bowen in 1765.** Economic Botany. v.37, p.371–379. 1983.
- WEI, Y., ZHANG, Z., ANDERSEN, C.H., SCHMELZER, E., GREGERSEN, P.L., COLLINGE, D.B., PETERSEN, V.S., CHRISTENSEN, H.T. **An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus.** Plant Molecular Biology, v.36, p.101–112. 1998.
- WHITTAKER, S.G., FAUSTMAN, E.M. **Effects of benzimidazole analogs on cultures of differentiating rodent embryonic cells.** Toxicology and Applied Pharmacology, v.113, p.144-151.1992.
- WIK, R.M. **Henry Ford's Science and Technology for Rural America, Technology and Culture.** v.3, n.3, p. 247-258, The Johns Hopkins University Press on behalf of the Society for the History of Technology. (Summer, 1962)
- WILSON, R.F. **Seed metabolism.** p.643–686. In: Wilcox, J.R. (ed.). Soybeans: Improvement, Production and Uses. Second Edition. Am. Soc. Agron., Madison, WI, 888p. 1987.
- WILSON, R.F. **Soybean: Market Driven Research Needs.** Em: Genetic and Genomics of Soybean. Vol.2. Springer Science+Business Media, LLC. 407p. 2008.
- WINFIELD, M.O., LU, C., WILSON, I.D., COGHILL, J.A., EDWARDS, K.J. **Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat.** Plant Biotechnology Journal, v.8, pp. 749–771, 2010.
- WOOD, T.E., TAKEBAYASHIC, N., BARKERB, M.S., MAYROSEE, I., GREENSPOOND, P.B., RIESEBERG, L.H. **The frequency of polyploid speciation in vascular plants.** Proceedings of the National Academy of Science, v.106, n.33, p.13875–13879. 2009.
- WRIGHT, S.I. **The effects of artificial selection on the maize genome.** Science, v.308, p.1310–1314. 2005.
- YAMAGISHI, N., YOSHIKAWA, N. **Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with Apple latent spherical virus vectors.** Plant Molecular Biology, v.71, n.1-2, p.15-24. 2009.

- YANG, X.B., TSCHANZ, A.T., DOWLER, W.M., WANG, T.C. **Development of yield loss model in relation to reduction of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*.** Phytopathology, v.81, p.1420-1426. 1991.
- YORINORI, J.T., NUNES, J.J., LAZZAROTTO, J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle.** Londrina: Embrapa Soja. 36p. (Documentos, 247). 2004.
- YORINORI, J.T., PAIVA, M.V., FREDERICK, R.D., COSTAMILAN, L.M., BERTAGNOLLI, P.F. **Epidemia da Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, em 2001 e 2002.** Fitopatologia Brasileira, v.27, p.S178-179, 2002.
- YORINORI, J.T., UTIAMADA, C.M., SATO, L.N., MUTTA, F.T.T., ROIM, F.B. **Perdas ocasionadas pela Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*).** Fitopatologia Brasileira, v.28, p.S210, 2003.
- ZAMBOLIN, L. **Ferrugem asiática da soja.** Viçosa-MG. p.1-15. 2006.
- ZELENY, J., HAVELKA, J., SLAMA, K. **Hormonally mediated insect-plant relationships: Arthropod populations associated with ecdysteroid-containing plant, *Leuzea carthamoides* (Asteraceae).** European Journal of Entomology, v.94, n.2, p.183-198. 1997.
- ZHANG, Z., COLLINGE, D.B., CHRISTENSEN, H.T. **Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus.** Plant J. v.8, p.139–145. 1995.
- ZHAO, H., ARNOLD, F.H. **Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes.** Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., v.94, p.7997–8000. 1997.
- ZHONG, W.F., FANG, J.C., CAI, P.Z., YAN, W.Z., WU, J., GUO, H.F. **Cloning of the *Bacillus thuringiensis* serovar sotto chitinase (Schi) gene and characterization of its protein.** Genetics and Molecular Biology, v.28, n.4, p.821-826. 2005.

EPÍLOGO

Durante a realização do estágio de doutorado sandwich na Universidade de Durham, um gene de uma defensina de café (CD1) foi expresso em *P. pastoris* e aproximadamente 10 mg de duas formas da proteína recombinante; sendo uma delas com His-tag na porção N-terminal (CD1tN) e outra com His-tag na porção C-terminal (CD1tC), foram produzidos. Essa segunda frente de trabalho do estágio visava, além de fortalecer o vínculo de colaboração com o grupo do Dr. John Gatehouse, com bastante experiência no tocante a peptídeos catiônicos com atividade inseticida, também aproveitar a experiência do grupo com tais moléculas e voltar esse conhecimento para abordagens antifúngicas.

De volta ao Brasil, ambas as formas de CD1 foram testadas contra *Fusarium solani*, o que indicou que o posicionamento da cauda de Histidina na porção N- ou C-terminal influenciava a ação antifúngica. Além disso, uma forma recombinante de CD1 fusionada à lectina de *Galanthus nivalis* (GNA). Foi construída e utilizada em ensaios de expressão em pequena escala. Os ensaios iniciais de expressão mostraram que a proteína de fusão era estável. A GNA é uma lectina de ligação a manose bastante utilizada pelo grupo do Dr. Gatehouse como molécula transportadora que direciona peptídeos catiônicos para a hemolinfa dos insetos (Fitches *et al.*, 2004a, Fitches *et al.*, 2008), e como já demonstrado, alguns peptídeos catiônicos inativos quando ingeridos pelo inseto, como no caso das defensinas, podem apresentar atividade quando alocados na hemolinfa. Adicionalmente a molécula recombinante CD1/GNA seria testada contra fungos, para os quais a porção lectínica atuaria na adesão de CD1/GNA à superfície do fungo, rica em resíduos de manose.

A construção gênica para a proteína de fusão GNA/CD1 está estabelecida, ensaios de expressão, purificação e atividade dessa molécula contra fungos e insetos serão realizados em um estágio de Pós-doutoramento que este autor deseja realizar junto ao Laboratório Planta-Praga I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

APÊNDICE

1. SOLUÇÕES

1.1. Tampão Tris/EDTA (T.E.)

Tris	0,1 M
EDTA	1 mM

pH 7.5 com HCl

1.2. Tampão de Sonicação

Tris	10 mM
MgCl ₂	5 mM
PMSF	2 mM

pH 7.5 com HCl

1.3. Tampão de Amostra (para ácidos nucleicos)

Glicerol 99%	30% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,25% (m/v)
Xileno cianol	0,25% (m/v)

** Para uma melhor performance os reagentes devem ser diluídos em tampão TBE 10X*

1.4. Tampão de Amostra (para proteínas)

Glicerol	40% (v/v)
Tris	240 mM
SDS	8% (m/v)
Azul de Bromofenol	0,04% (m/v)

1.5. Tampão de Corrida (Eletroforese em gel de agarose para ácidos nucleicos; tampão TBE)

Tris	89 mM
Ácido bórico	89 mM
EDTA	2 mM

pH 8.3 com NaOH

1.6. Tampão de Corrida (SDS-PAGE)

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (m/v)

1.7. Solução corante Commassie Blue-R

Commassie Blue-R	0,1% (m/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

1.8. Tampão PBS

NaCl	0,13 M
KCl	2,6 mM
NaHPO ₄	5,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,7 mM

pH 7.4 com HCl

1.9. Tampão de Transferência (semi-seco)

Metanol	20% (v/v)
Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,037% (m/v)

1.10. Solução de Reidratação

Uréia	7 M
Tiouréia	2 M
DTT	65 mM
CHAPS	2% (m/v)
Pharmalyte	0,5% (v/v)
Azul de bromofenol	traços

** Prepara solução de Uréia 7M/Tiouréia 2M e adicionar os demais reagentes a alíquotas de 1 mL dessa solução*

1.11. Substrato para Horseradish Peroxidase (HRP)

HRP	15 mg/mL
Metanol	16% (v/v)
H ₂ O ₂ 30%	0,6% (v/v)
Tampão PBS	84% (v/v)

2. MEIOS DE CULTURA

2.1. Meio Caldo Nutritivo

Meio caldo nutritivo	8 g/L
Extrato de levedura	1 g/L
KH ₂ PO ₄	7,3 mM
Solução de sais♦	1% (v/v)

pH 7.0 com KOH

** Se sólido, adicionar 1,5% (m/v) de agar*

2.2. Meio LS-LB/Zeocina

NaCl	5 g/L
Peptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Zeocina	0,05 mg/mL

pH 7.5 com NaOH

** Se sólido, adicionar 1,5% (m/v) de agar*

2.3. Meio YPG/Zeocina

Extrato de levedura	1% (m/v)
Peptona	2% (m/v)
Glicerol	4% (v/v)
Zeocina	100 µg/mL

** Se sólido, adicionar 1,5% (m/v) de agar*

*** Não precisa ajustar o pH*

2.4. Meio de Fermentação

Ácido fosfórico	80,1 mL
Sulfato de cálcio	2,8 g
Sulfato de potássio	54,6 g
Sulfato de magnésio	44,7 g
Hidróxido de potássio	12,4 g
Glicerol 99% (1,25 g/mL)	96 mL
Água q.s.p	3,0 L

♦ CaCO₃ 0,1 g/L, MgSO₄ 7H₂O 0,1 g/L, FeSO₄ 7H₂O 0,01 g/L, MnSO₄ 7H₂O 0,01 g/L, ZnSO₄ 7H₂O 0,01 g/L

3. PROCEDIMENTOS

3.1. Purificação de DNA *in gel* ou *in solution* com o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (50) (Quiagen)

- i) Aferir a massa do pedaço de gel e adicionar Tampão QG na proporção de 3 μ L para cada 1 mg de gel.
- ii) Manter a 60 °C por 10 min. Agitar eventualmente.
- iii) Adicionar isoprpanol na proporção de 1 μ L para cada mg de gel.
- iv) Transferir para uma coluna QIAquick acoplada a um tubo coletor de 2 mL. Centrifugar por 1 min.
- v) Descartar o não retido e adicionar 750 μ L do Tampão PE (com etanol). Centrifugar por 1 min.
- vi) Descartar o não retido e centrifugar novamente para secar.
- vii) Acoplar a coluna a um novo tubo de 1.5 mL e adicionar 30 μ L de água ao centro da coluna. Deixar a coluna por 1 min sobre a bancada antes de centrifugar por 1 min.
- viii) Coletar o material contendo o DNA.

3.2. Transformação de *E. coli* Top 10

- i) Adicionar 0,7 μ L da solução contendo o vetor numa alíquota de células competentes.
- ii) Homogeneizar e transferir para uma cuveta de eletroporação de 1,5 mm gelada.
- iii) Pulso de 25 μ FD, 200 Ω , 1,8 V. (Constante de tempo aprox. 4.0)
- iv) Adicionar 750 μ L de meio LS-LB na cuveta e transferir as células transformadas para um tubo eppendorf.
- v) Manter as células a 37 °C por 1 h.
- vi) Inocular 100 μ L das células numa placa contendo meio LS-LB/Zeocina 0,05 mg/mL e incubar as placas durante a noite a 37 °C.

- vii) Selecionar 3 colônias e inocular em 5 mL de meio líquido LS-LB/Zeocina 0,05 mg/mL. Manter as culturas a 37 °C sob agitação de 250 rpm durante a noite para extração de DNA plasmidial.

3.3. Extração de DNA Plasmidial de *E. coli* Top 10

(Wizard Plus. SV Minipreps; DNA Purification System – Promega)

- i) Centrifugar as culturas a 3.000 g/10 min/25 °C.
- ii) Adicionar 250 µL de “Solução de Suspensão de Células”. Agitar suavemente e transferir para tubos eppendorf.
- iii) Adicionar 250 µL de “Solução de Lise de Células”, agitar suavemente. Adicionar 10 µL da solução de protease alcalina, agitar suavemente. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.
- iv) Adicionar 350 µL da “Solução de Neutralização”; agitar suavemente. Centrifugar a 10.000 g /10 min/25 °C.
- v) Tomar o sobrenadante cuidadosamente e transferir para uma coluna acoplada a um tubo coletor. Centrifugar a 10.000 rpm/1 min/25 °C.
- vi) Descartar o material do tubo coletor e adicionar 750 µL da “Solução de Lavagem”. Centrifugar nas mesmas condições e descartar o material do tubo coletor. Adicionar 250 µL da “Solução de Lavagem”, centrifugar nas mesmas condições e descartar o material do tubo coletor. Centrifugar novamente apenas para secar a coluna (2 min).
- vii) Acoplar a coluna a um novo tubo, adicionar 100 µL de água deionizada livre de nuclease e centrifugar (10.000 rpm/1 min/25 °C). O plasmídeo deverá estar no material coletado (concentração aprox. 70 ng/µL).

ANEXOS

1. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO

1.3. Relacionados à tese

Vasconcelos et al. *BMC Biotechnology* 2011, **11**:14
<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/14>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination

Erico AR Vasconcelos¹, Celso G Santana¹, Claudia V Godoy², Claudine DS Seixas², Marília S Silva³, Leonora RS Moreira⁴, Osmundo B Oliveira-Neto¹, Daniel Price⁵, Elaine Fitches⁵, Eivaldo XF Filho⁴, Angela Mehta¹, John A Gatehouse⁵, Maria F Grossi-De-Sa^{1*}

Abstract

Background: Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) is a common disease in Brazilian soybean fields and it is difficult to control. To identify a biochemical candidate with potential to combat this disease, a new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) (CaclXIP) leaves was cloned into the pGAPZ α -B vector for expression in *Pichia pastoris*.

Results: A cDNA encoding a chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) (CaclXIP), was isolated from leaves. The amino acid sequence predicts a (β/α)₈ topology common to Class III Chitinases (glycoside hydrolase family 18 proteins; GH18), and shares similarity with other GH18 members, although it lacks the glutamic acid residue essential for catalysis, which is replaced by glutamine. CaclXIP was expressed as a recombinant protein in *Pichia pastoris*. Enzymatic assay showed that purified recombinant CaclXIP had only residual chitinolytic activity. However, it inhibited xylanases from *Acrophialophora nainiana* by approx. 60% when present at 12:1 (w/w) enzyme:inhibitor ratio. Additionally, CaclXIP at 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ inhibited the germination of spores of *Phakopsora pachyrhizi* by 45%.

Conclusions: Our data suggests that CaclXIP belongs to a class of naturally inactive chitinases that have evolved to act in plant cell defence as xylanase inhibitors. Its role on inhibiting germination of fungal spores makes it an eligible candidate gene for the control of Asian rust.

Background

The plant surface is a complex molecular battlefield during plant-pathogen or plant-pest interaction. During infection, plant cells produce a group of proteins, coded by non-homologous genes, named Pathogenesis Related (PR) Proteins. Seventeen PR-proteins families have been identified based on biological activity, which can range from cell-wall/membrane degrading enzymes, to protease inhibitors, and proteins related to oxidative metabolism [1]. Each PR-protein family has a specific role

during plant-pathogen interaction. Some of them act as “attack” molecules to damage the pathogen, while others act as “defence” molecules, to protect plant cells from the molecular attack of pathogens. Villamil and Hoorn [2] review aspects of this “zig-zag” model of plant-pathogen interaction.

Xylanase inhibitor proteins (XIP) are potential “defence” molecules, which could act to prevent plant cell wall degradation by fungal hydrolytic enzymes. They have sequence similarity to glycoside hydrolases of family 18 (GH18) that are plant class III chitinases (PR-8). The GH18 family includes naturally inactive chitinases showing (β/α)₈ topology that are predicted to show no catalytic activity due to mutations in the

* Correspondence: fatimasa@cenargen.embrapa.br

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final). Postal box 02372 - Brasília, DF- 70770-917 - Brasil
Full list of author information is available at the end of the article



MAGALHÃES, M. T. Q., VASCONCELOS, E. A. R., SILVA, T. S., FRAGOSO, R. R., SILVA, S. M. B., SAMPAIO, R. O., OLIVEIRA-NETO, O. B., BATISTA, J. A. N. AND GROSSI DE SÁ, M. F.

Toxin profile from a *Bacillus thuringiensis* strain active towards

Lepidoptera and Coleoptera Insect Pests.

Archives of Microbiology

(em preparação)

Rooteomics: The Challenge of Discovering Plant Defense-Related Proteins in Roots

Angela Melhta^{1,*}, Beatriz S. Magalhães^{1,a}, Djair S. L. Souza^{1,a}, Erico A. R. Vasconcelos^{1,a}, Luciano P. Silva^{1,a}, Maria Fátima Grossi-de-Sa^{1,2,a}, Octávio L. Franco^{2,3,a}, Paulo H. A. da Costa^{1,a}, and Thales L. Rocha^{1,a}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil; ²Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; ³Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

Abstract: In recent years, a strong emphasis has been given in deciphering the function of genes unraveled by the completion of several genome sequencing projects. In plants, functional genomics has been massively used in order to search for gene products of agronomic relevance. As far as root-pathogen interactions are concerned, several genes are recognized to provide tolerance/resistance against potential invaders. However, very few proteins have been identified by using current proteomic approaches. One of the major drawbacks for the successful analysis of root proteomes is the inherent characteristics of this tissue, which include low volume content and high concentration of interfering substances such as pigments and phenolic compounds. The proteome analysis of plant-pathogen interactions provides important information about the global proteins expressed in roots in response to biotic stresses. Moreover, several pathogenic proteins superimpose the plant proteome and can be identified and used as targets for the control of viruses, bacteria, fungi and nematode pathogens. The present review focuses on advances in different proteomic strategies dedicated to the challenging analysis of plant defense proteins expressed during bacteria-, fungi- and nematode-root interactions. Recent developments, limitations of the current techniques, and technological perspectives for root proteomics aiming at the identification of resistance-related proteins are discussed.

Keywords: Roots, proteome, 2DE, mass spectrometry.

INTRODUCTION

Root tissues represent an important structure for plant growth and development, and are continuously invaded by microorganisms, which cause deleterious effects that culminate in the development of disease and/or death of the plant. Roots are intrinsically complex tissues to explore and slow progress has been made in discovering plant-genes and proteins in these tissues governing the interaction of plant pathogens and their hosts. Most studies are focused on the developmental aspects of roots and with the increase in the availability of expressed sequence tag (EST) sequences, several genes involved in cell cycle, cell growth, abiotic stresses and hormone signaling have been identified [1-5].

In recent years, the application of proteomic approaches as a tool for global expression analysis and protein identification has been highly efficient in the field of protein research. Improvements in the main techniques and equipments for 2-DE (bidimensional gel electrophoresis) and mass spectrometry have allowed a high throughput analysis of protein expression in different fields. While the proteomics research is greatly advanced in animals, plant proteomics has

not yet reached a sufficient level of complexity to identify and study plant proteins involved during the pathogen-host plant interactions. Many proteins involved in the mechanisms of response to biotic/abiotic stress signals are present in low abundance and thus are not easily detectable in crude extracts. Major studies in plant proteomics involve subcellular proteomes, including chloroplasts, mitochondria, nuclei and plasma membranes [6-11] and most of them still rely on 2-DE separations of crude cellular extracts.

The study of proteins has also become progressively more important since it is now well established that there is little correspondence between the transcript and protein levels [12, 13]. Post-translational modifications such as the removal of signal peptides, phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, among others are important processes for protein function and subcellular localization which are not accounted for using genomic strategies [14]. Therefore, proteomics is playing an increasingly important role in addressing these issues and has become a necessary and complementary approach in the post-genomic era. Furthermore, by analyzing the proteins being expressed during a specific condition, information regarding the genes/proteins that are co-regulated and act together in response to a given stress can be identified. Nevertheless, the root proteomics (here termed rooteomics) analysis is still insipient when compared to other plant tissues and even more when compared to other organisms such as prokaryotes, yeasts and mammals [15]. One of the major factors responsible for the limited data re-

*Address correspondence to this author at the Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB Av. W/5 Norte Final, Asa Norte, CEP 70770-900 Brasília, DF, Brazil; Tel: +55 61 3448-4901; Fax: +55 61 3340-3658; E-mail: amelhta@cenargen.embrapa.br

^aThese authors are arranged alphabetically by author's first names since they contributed equally to the work.

1.2. Não relacionados à tese

Cancer Immunol Immunother (2010) 59:173–181
DOI 10.1007/s00262-009-0741-4

ORIGINAL ARTICLE

Comparative proteomical and metalloproteomical analyses of human plasma from patients with laryngeal cancer

Clarissa P. C. Gomes · Mirna S. Freire · Bruno R. B. Pires · Érico A. R. Vasconcelos ·
Thales L. Rocha · Maria de Fátima Grossi-de-Sá · Taia M. B. Rezende ·
Ângela Mehta · Rinaldo W. Pereira · Bernardo A. Petriz · Aparecido D. da Cruz ·
Igor C. Pescara · Octávio Luiz Franco

Received: 22 April 2009 / Accepted: 8 July 2009 / Published online: 23 July 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Laryngeal cancer is a significant disease worldwide, which presents an increasing incidence. Two contrasting ideas of the immune system role during cancer development are accepted: (1) it fights tumor cells, and (2) it aids tumor progression. Thus, there is no clear understanding about the immune response in laryngeal cancer. Furthermore, since tobacco is the main cause of laryngeal cancer and it contains various carcinogenic components, including metallic elements, these may play a role on cancer development. Plasmas of patients with laryngeal cancer and of healthy smokers were evaluated by 2D gel

electrophoresis and mass spectrometry. Proteins were detected on every gel around pH 4.0–10.0 from molecular mass of 10–60 kDa. Few differences were found among cancer and control patients. However, three spots gathered between pI 7.3 and 7.6 with different molecular masses appeared exclusively in cancer profiles. From ten spots identified, six correspond to immune system components, including the three differential ones. The latter were observed only in cancer patients. The presence of several trace elements in the identified proteins was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry, where chromium was increased in all proteins analyzed from patients with cancer. This study reinforces the importance of the immune response as target in the understanding and treatment of laryngeal cancer and the possibility that chromium is important in the carcinogenic progress.

Keywords Laryngeal cancer · Immunology · Proteomics · Human plasma · Trace elements

C. P. C. Gomes · M. S. Freire · B. R. B. Pires ·
T. M. B. Rezende · R. W. Pereira · B. A. Petriz ·
O. L. Franco (✉)

Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas
e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília,
SGAN Quadra 916, Av. W5 Norte, Módulo C, 70,
Brasília, DF 790-160, Brazil
e-mail: ocfranco@gmail.com

É. A. R. Vasconcelos · T. L. Rocha ·
M. de Fátima Grossi-de-Sá · Â. Mehta
Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation)
Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

É. A. R. Vasconcelos
Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

A. D. da Cruz
Universidade Católica de Goiás,
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa,
Goiânia, Brazil

I. C. Pescara
Laboratório de Espectroscopia Atômica,
Hospital da Universidade Católica de Brasília,
Brasília, Brazil

Introduction

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is a significant disease worldwide, and accounts for 90% of all malignancies of the larynx. Much of its increasing incidence is related to tobacco and alcohol consumption, which have a clear synergistic effect [1]. Given the few signs and symptoms of early-stage disease, these tumors are usually discovered in advanced-stages, when more severe treatments are needed, often leaving patients with debilitating functions. The survival rates for advanced-stage disease are less than 50% [2].

Tobacco and tobacco smoke contain several metallic elements associated to cancer development [3]. The

2. DOCUMENTOS RELATIVOS AO ESTÁGIO SANDUÍCHE NO EXTERIOR

2.1. Carta de benefícios do CNPq



869066500055528

Érico Augusto Rosas de Vasconcelos
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/CENARGEN
S.A.I.N. Parque Rural, Final W5, Asa Norte
70770-990 - BRASÍLIA - DF - Brasil

Diretoria de Programas Temáticos e Setoriais
Coordenação-Geral do Programa de Pesquisa Em Saúde
Coordenação do Programa de Pesquisa em Biociências
PROGRAMA BÁSICO DE BIOQUÍMICA

Ofício SN/CGEFO/CNPq

Brasília, 17 de junho de 2008

Processo número 200424/2008-4 (Novo)

Comitê Assessor BF

Modalidade SWE

Inst.: University of Durham/Inglaterra

Em aditamento a mensagem eletrônica na qual lhe foi comunicada a concessão de uma bolsa de estudos no exterior, vimos informar-lhe os benefícios, prazos e condições da referida bolsa, em conformidade com as normas em vigor no CNPq.

Modalidade: Doutorado Sanduíche no Exterior

Vigência: 01/08/2008 até 31/01/2009

Mês de remessa da documentação para análise quanto à renovação (se pertinente): Outubro

Benefícios:

Mensalidade: LIBRA(GBP) 776,00 (valor-base: LIBRA(GBP) 776,00)

Seguro-Saúde: LIBRA(GBP) 0,00

Auxílio Instalação (parte fixa): LIBRA(GBP) 388,00

Passagens aéreas para o trecho: Espanha/Brasília/Inglaterra/Durham

CONDIÇÕES

1 - A implementação da bolsa está condicionada a assinatura e devolução da Procuração e do Termo de Compromisso, para o seguinte endereço:

Serviço de Bolsas Individuais no Exterior - SEBIE
SEPN 509, Térreo
CEP 70750-501 - Brasília - DF

2 - Caso V.Sª se fizer acompanhar de dependentes, o acréscimo ao valor-base da mensalidade só será implementado durante a permanência dos mesmos em sua companhia por um período superior a 6 (seis) meses. A entrada do dependentes no país de destino deverá ser comprovada no prazo de 60 (sessenta) dias pela apresentação dos bilhetes de passagem utilizados e cópia dos passaportes contendo os vistos de entrada naquele país. O não atendimento desta condição acarretará a imediata dedução do acréscimo por dependentes e o desconto dos valores já creditados.

3 - No prazo de 60 (sessenta) dias contados a partir da data de embarque, V.Sa deverá encaminhar ao CNPq se bilhete de passagem juntamente com o comprovante de matrícula na Instituição para a qual teve sua bolsa aprovada (obrigatório para o doutorado pleno) ou declaração da Instituição/orientador atestando o início das atividades para as outras modalidades. Deverá, ainda, enviar para o e-mail sebie@cnpq.br o seu endereço definitivo e informar na página do CNPq na Internet os dados bancários no exterior, no endereço <http://folhadepagamento.cnpq.br/dadosbancarios/>. O atendimento a estas exigências é imprescindível para a manutenção do pagamento das mensalidades.

4 - No prazo de 60 (sessenta) dias após a data de recebimento do adiantamento para o seguro-saúde, o bolsista deve apresentar cópia da apólice, devidamente quitada, contendo o valor pago, o período coberto e nome dos dependentes segurados. Caso isto não ocorra, o CNPq deduzirá o valor adiantado.

OBSERVAÇÃO IMPORTANTE: O pagamento das mensalidades no exterior é efetuado trimestralmente, nos meses de Fevereiro, Maio, agosto e Novembro de cada ano civil, mediante depósito em conta bancária do bolsista conforme o cronograma abaixo:

- janeiro/fevereiro/março, crédito entre os dias 20 e 28 de fevereiro
- abril/maio/junho, crédito entre os dias 20 e 31 de maio
- julho/agosto/setembro, crédito entre os dias 20 e 31 de agosto
- outubro/novembro/dezembro, crédito entre os dias 20 e 30 de novembro

O bolsista não incluído no cronograma acima, terá seu pagamento efetivado em folha suplementar.

Caso V. Sa. tenha recebido outro ofício com a mesma finalidade, solicitamos desconsiderá-lo.

Atenciosamente

Jovan Guimaraes Gadioli dos Santos
Coordenador-Geral
PO=087/2003

2.2. Carta do orientador no Brasil: comentários finais sobre o desempenho do bolsista



Dra. Maria Fátima Grossi de Sá,
Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I
Prédio de Biotecnologia (PBI)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília – DF, Brasil

Tel: 55 61 3448 4902

E-mail: fatimasa@cenargen.embrapa.br

26 de fevereiro de 2009

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico, CNPq.

Comentários finais sobre o desempenho do estudante **Érico Augusto Rosas de Vasconcelos** no programa de bolsas de estudos no exterior, modalidade: doutorado sanduíche no exterior.

O estudante sob minha supervisão executou seu estágio de agosto de 2008 a janeiro de 2009. Período no qual trabalhou intensamente no seu projeto alcançando resultados animadores na clonagem e expressão heteróloga de genes de defesa vegetal, bem como na purificação das proteínas recombinantes, produtos dos genes em questão. As proteínas produzidas serão agora utilizadas em bioensaios de atividade contra pragas que afetam os campos de algodão no Brasil.

Frente às condições adversas, o estudante, com maturidade, contornou obstáculos levando ao esclarecimento de questões científicas relevantes. Na sua interação com o grupo de pesquisa no exterior, fortaleceu ainda mais o vínculo de colaboração entre os grupos ao produzir uma molécula recombinante composta por genes pertencentes a ambas as partes.

Avalio como satisfatório o relatório técnico produzido pelo estudante, o qual certamente lhe servirá para a composição de suas publicações científicas.

Maria Fátima Grossi de Sá

*Pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia*

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Empresa Brasileira de
Pesquisa Agropecuária
Embrapa

Recursos Genéticos e
Biotecnologia

PqEB Parque Estação Biológica
Final W-5 Norte
Brasília, DF
CEP 70770-900
Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4700
Tel.: (61) 448-4600
448-4603
448-4713
Fax: (61) 340-3624

2.3. Carta do orientador no exterior: comentários finais sobre o desempenho do bolsista



Durham
University

School of Biological
and Biomedical Sciences

Shaped by the past, creating the future

Dr John A. Gatehouse,
Reader in Biological Sciences,
School of Biological and Biomedical Sciences,
University Science Laboratories, South Road,
Durham DH1 3LE, United Kingdom

Tel: 0191 334 1264

Fax: 0191 334 1201

E-mail: J.A.Gatehouse@durham.ac.uk

14 abril 2011

To whom it may concern:

Report on Erico A. Rosas

Erico Rosas spent approx. 5 months in my laboratory as part of his research for a Ph.D programme. He proved a competent scientist, who fitted into the existing set-up without any problems.

In terms of work achieved, Erico worked consistent hours in the lab, and produced some good results after an initial period when he was being trained in our methods and was adjusting to a different culture. Overall, his achievement was good, and he finished his time in Durham having produced two recombinant proteins in quantities sufficient for bioassays, and having assembled and tested a construct for a third. Erico was very focussed on his programme, which proved both a strength and a weakness. His ability to focus on what he wanted to achieve meant that he went away with a good amount of work completed. However, the same focus meant that he lost some opportunities for interacting with the host laboratory. Particularly, his intellectual engagement with the research going on in the lab was limited, and he showed little interest in picking up new ideas and techniques that were not directly relevant to his own programme. I feel he would be a better scientist for being a little more open to the general research environment and the wider scientific community.

Erico was an agreeable person to have in a laboratory, in that he caused virtually no trouble or fuss during his entire stay. He was competent, and reliable. He gave a good lab presentation on his work for his PhD, and has written a satisfactory report on his work in Durham.

A handwritten signature in black ink that reads "John Gatehouse". The signature is written in a cursive style with a large initial 'J'.

John Gatehouse, Reader in Biological Sciences.

Science Laboratories South Road Durham DH1 3LE UK
Telephone +44 (0)191 334 1200 Fax +44 (0)191 334 1201
www.durham.ac.uk

2.4. Certificado de conclusão do estágio



DECLARAÇÃO DE CONCESSÃO DE BOLSA

Declaramos, para os devidos fins e a pedido do interessado, que o Sr. **ÉRICO AUGUSTO ROSAS DE VASCONCELOS**, CPF nº **782.289.643-15**, foi detentor junto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, por meio do processo nº **200424/2008-4**, de bolsa de estudos no exterior na modalidade de **Doutorado Sanduíche-SWE**, junto a **University of Durham**, na **Inglaterra**, no período de **01/08/2008 a 31/01/2009**.

Declaramos que os benefícios foram pagos com recursos provenientes do Tesouro Nacional, a título de bolsa de estudos e de pesquisa, não se caracterizando vínculo empregatício para com este Conselho, não cabendo, portanto, recolhimento de contribuições previdenciárias.

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente para os efeitos legais pertinentes.

Brasília-DF, 28 de dezembro de 2010

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'José Airton de Souza', is positioned above the printed name and title.

José Airton de Souza
Chefe de Serviço de
Bolsas Individuais no Exterior - PO - 055/2010

3. TRABALHO APRESENTADOS EM ENCONTROS, CONGRESSOS E WORKSHOP

1. VASCONCELOS, E. A. R., SANTANA, C. G., Godoy, C.V., Silva, M.S., Moreira L.R.S., Oliveira-Neto O.B, Price, D., FICTHES, E., Filho, E.X.F., Mehta, A., Gatehouse, J.A., Grossi-de-Sa, M.F.

A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination In: 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza.

3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia. , 2010.

2. VIEIRA, G. M., VASCONCELOS, E. A. R., Grossi-de-Sa, M.F.

Proteoma comparativo do FCG: busca por marcadores protéicos da reabsorção radicular externa In: 17º Congresso Brasileiro de Ortodontia, 2010, São Paulo.

17º Congresso Brasileiro de Ortodontia. , 2010.

3. VASCONCELOS, E.A.R., SANTANA, C.G., OLIVEIRA NETO, O.B., PRICE, D., FITCHES, E., MEHTA, A., GATEHOUSE, J.A., GROSSI-DE-SA, M.F.

Cloning, Structure Prediction, Heterologous Expression and Biological Role of a Class III Chitinase Paralogous Gene from Coffee (*Coffea arabica*) In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. , 2009.

4. SILVA, T. S., VASCONCELOS, E. A. R., ROCHA, T. L., GROSSI-DE-SA, M. F.

Chitinolytic Activity in Proteic Extracts of *Bacillus thuringiensis* Toxic to Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2008, Águas de Lindóia.

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. , 2008.

5. GOMES, C. P. C., PIRES, B. R. B., VASCONCELOS, É. A. R., ROCHA, T. L., GROSSI-DE-SÁ, M. F., PEREIRA, R. W., FRANCO, O. L.

Proteomic Search For Molecular Markers In Human Plasma For Laryngeal Cancer Detection In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2008, Águas de Lindóia.

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. , 2008.

6. PIRES, B. R. B., GOMES, C. P. C., PEREIRA, R. W., VASCONCELOS, É. A. R., ROCHA, T. L., GROSSI-DE-SA, M. F., FRANCO, O. L.

Two-Dimensional Electrophoretical Analyses Of Non-Hodking's Lymphoma Tissue In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2008, Águas de Lindóia.

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. , 2008.

7. VASCONCELOS, E. A. R., SILVA, T. S., ROCHA, T. L., GROSSI DE SA, M. F.

2D-E Reference Maps of Cellular and Secreted Proteins from *Bacillus thuringiensis* (S811) During Growth and Sporulation In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2008, Águas de Lindóia.

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. , 2008.

8. VASCONCELOS, E. A. R., SILVA, T. S., MAGALHÃES, J. C., ROCHA, T. L., GROSSI DE SA, M. F.

Proteomic Characterization Of *Bacillus thuringiensis* S811 Strain And Evaluation Of Proteins

Toxicity Towards *Anthonomus grandis* In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2007, Salvador.

XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. , 2007.

9. VASCONCELOS, E. A. R., MAGALHÃES, M. T. Q., MAGALHÃES, J. C., ROCHA, T. L., GROSSI DE SA, M. F.

Proteomic analysis of growing- and sporulating-*Bacillus thuringiensis* (S811) and activity towards *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) larvae In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006, Águas de Lindóia.

XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. , 2006.