

CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE LECTINAS MANOSE
ESPECÍFICAS TÓXICAS E O TRATO DIGESTIVO DO PULGÃO DA ERVILHA,
Acyrtosiphon pisum (HARRIS)

FLÁVIA ANDREA MENDONÇA DE SOUSA

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 2001

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Flávia Andrea Mendonça de Sousa

TESE APROVADA EM 17/05/2001

Prof. Dr. ~~Benildo Sousa Cavada~~

Orientador de Tese

Presidente

Dr. Yvan Rahbé

Co-orientador de Tese

Prof. Dr. Cláudia Ferreira Santos

Conselheiro

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Conselheiro

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Conselheiro

Aos meus pais,
A Socorro e Luciana,
Ao Ramiro,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Benildo Sousa Cavada como orientador de tese e por ter participado na minha formação durante a Iniciação Científica e Mestrado realizados no Biomol-Lab. De personalidade marcante e estilo empreendedor foi o responsável direto pela realização do projeto que sem a sua credibilidade e incentivo nunca poderia ter sido concretizado.

Ao Dr. Yvan Rahbé, co-orientador de tese, que ao idealizar o projeto de tese motivou a sua realização permitindo minha estadia no laboratório *Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions* (BF2I) em Lyon e participando de forma valiosa na avaliação e discussão dos resultados.

Aos professores Thalles Barbosa Grangeiro, Cláudia Ferreira Santos e Fernando João Montenegro de Sales, por tê-los na comissão julgadora responsável pela avaliação deste trabalho enriquecendo-o através de comentários pertinentes e sugestões valiosas.

Aos professores José Roberto Postali Parra (ESALQ – Piracicaba) e Simon Grenier (BF2I - Lyon), coordenadores do projeto CAPES-COFECUB 261/98.

De forma especial, ao laboratório *Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions* (BF2I) em Lyon nas pessoas de Gérard Febvay (diretor), Bernard Delobel, Gabrielle Duport, Josette Guillaud e Isabelle Rahioui que contribuíram para realização deste trabalho.

A Dra. Lise Jouanin pela acolhida no laboratório de Biologia Molecular com sede no INRA de Versailles (França) e as estudantes Céline Deraison e Line Duportets responsáveis pela construção da biblioteca genômica do pulgão.

Aos colegas, Nylane Maria Nunes, Dárlcio Inácio Teixeira, Vânia Ceccato, Renato Isidro, Vicente de Paula Pinto e Moema Barbosa Grangeiro pela colaboração, interesse e amizade.

As amigas, Francislete Rodrigues, Nádia Accioly Nogueira e Izabel Mesquita Moreira da Silva pelo companheirismo.

A todos os professores, bolsistas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela cooperação na realização desta tese.

Especialmente a minha família, parentes próximos e amigos que sempre estiveram presentes, pelo apoio e incentivo incansável.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pós-graduação concedida a autora através de convênio com o curso de pós-graduação em Bioquímica, e por auxílios de pesquisa ao Biomol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Doutorado-sanduíche concedida a autora através do projeto de pesquisa CAPES-COFECUB 261/98 tipo II e por auxílios de pesquisa ao Biomol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Comité Français d'Évaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil (COFECUB) por auxílios destinados ao projeto de pesquisa CAPES-COFECUB 261/98 tipo II.

Institut National de Recherche Agronomique (INRA) e ao Institut National des Sciences Appliquées (INSA) por auxílios de pesquisa ao laboratório *Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I)*.

Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I), laboratório pertencente ao UMR INRA/INSA de Lyon, onde realizou-se a parte experimental da tese.

Biomol-Lab, laboratório pertencente ao DBBM - UFC onde realizou-se a purificação de lectinas utilizadas na parte experimental da tese.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujas dependências foi realizado parte deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

RESUMO

ABSTRACT

1 -	INTRODUÇÃO	18
1.1 -	INSETOS	20
1.1.1 -	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Homoptera: Aphididae)	21
a -	Morfologia e anatomia	22
b -	Danos e controle	22
1.2 -	LECTINAS VEGETAIS	24
1.2.1 -	Definição e Considerações Gerais	24
1.2.2 -	Lectinas da Subtribo Diocleinae	26
1.2.3 -	Lectinas da Super Família Monocotiledônea	29
1.2.4 -	Atividade Inseticida de Lectinas	30
1.2.5 -	Localização dos Sítios de Ligação das Lectinas em Insetos	32
1.3 -	OBJETIVO	34
1.3.1 -	Objetivo Geral	34
1.3.2 -	Objetivos Específicos	35
2 -	MATERIAIS	36
2.1 -	LECTINAS	36
2.2 -	PLASMÍDIOS, CEPAS BACTERIANAS E ENZIMAS	36
2.3 -	OUTROS MATERIAIS	37
3 -	MÉTODOS	38
3.1 -	PREPARAÇÃO DE LECTINAS	38
3.2 -	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE LECTINAS	39
3.2.1 -	Manutenção e Produção de <i>Acyrtosiphon pisum</i>	39
3.2.2 -	Manutenção e Produção de <i>Sitophilus orizae</i>	39
3.2.3 -	Composição e Preparação da Dieta Artificial para <i>Acyrtosiphon pisum</i>	39

3.2.4 -	Teste de Toxicidade “in vitro” com <i>Acyrtosiphon pisum</i>	40
3.2.5 -	Teste de Toxicidade “in vitro” com <i>Sitophilus oryzae</i>	40
3.2.6 -	Análise dos Dados de Toxicidade	41
a -	Taxa de Sobrevivência	41
b -	Inibição do Crescimento	41
3.2.7 -	Ensaio de Inibição por Açúcar	45
3.2.8 -	Ensaio de Toxicidade com Lectina Desmetalizada	45
3.3 -	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES DA CON BR NO TRATO DIGESTIVO DE <i>Acyrtosiphon pisum</i>	46
3.3.1 -	Dissecção de Tratos Digestivos	46
3.3.2 -	Marcação de Lectinas com Biotina	46
3.3.3 -	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante de Extratos de Tratos Digestivos de <i>Acyrtosiphon pisum</i>	47
3.3.4 -	Lectin Blot	47
3.3.5 -	Imobilização de Con Br em Agarose	48
3.3.6 -	Extração de Proteínas de Tratos Digestivos de <i>Acyrtosiphon pisum</i>	50
3.3.7 -	Cromatografia de Afinidade em coluna de Con Br–Agarose de Extratos de Tratos Digestivos de <i>Acyrtosiphon pisum</i>	50
3.3.8 -	Eletroforese Bidimensional do pIII da Cromatografia de Afinidade em Con Br - Agarose	51
3.3.9 -	Microsequenciamento de Proteínas	52
3.4 -	CLONAGEM DE UMA AMINOPEPTIDASE LOCALIZADA NO TRATO DIGESTIVO DO <i>Acyrtosiphon pisum</i>	52
3.4.1 -	Extração do ARN _{total} e purificação do ARN _{mensageiro} de <i>Acyrtosiphon pisum</i>	52
3.4.2 -	Construção da Biblioteca Genômica do <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	53
3.4.3 -	Oligonucleotídeos	53
3.4.4 -	Amplificação do Gene Parcial da Aminopeptidase por Reação em Cadeia da DNA polimerase (PCR)	55
3.4.5 -	Purificação do cDNA Amplificado da Aminopeptidase e Clonagem no Vetor pMosBlue	56
3.4.6 -	Sequência do Gene Parcial da Aminopeptidase de <i>Acyrtosiphon</i>	

	<i>pisum</i>	57
4 -	RESULTADOS	58
4.1 -	EFEITOS DE LECTINAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO NINFAL DE <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	58
4.1.1 -	Mortalidade	58
4.1.2 -	Inibição do Crescimento	59
4.2 -	EFEITOS DA CON BR SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE ADULTOS DE <i>Sitophilus oryzae</i>	70
4.3 -	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DE LECTINAS PELA ADIÇÃO DE AÇÚCAR OU DESMETALIZAÇÃO	70
4.4 -	COMPORTAMENTO DA CON BR APÓS INGESTÃO PELO <i>Acyrtosiphon pisum</i>	70
4.5 -	IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE ALVOS MOLECULARES DO TRATO DIGESTIVO DE <i>Acyrtosiphon pisum</i>	75
4.5.1 -	Lectin Blot de Proteínas do Trato Digestivo de <i>A.pisum</i>	75
4.5.2 -	Cromatografia de Afinidade em Con Br-Agarose e PAGE 2D	75
4.5.3 -	Sequenciamento de Proteínas	79
4.6 -	CLONAGEM DE UMA AMINOPEPTIDASE DE TRATOS DIGESTIVOS <i>Acyrtosiphon pisum</i>	83
5 -	DISCUSSÃO	87
6 -	CONCLUSÃO	94
7 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
8 -	APÊNDICE	111

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Afídeos, fases ninfais (a) e peças bucais (b).	23
2 - Câmaras de bioensaio para a avaliação dos efeitos de lectinas sobre o crescimento de <i>Acyrtosiphon pisum</i> (a) e <i>Sitophilus oryzae</i> (b).	43
3 - Lectin Blot, procedimento para detecção de glicoconjugados do trato digestivo de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	49
4 - Construção da biblioteca genômica do pulgão, <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	54
5 - Sobrevivência das ninfas de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em dieta artificial contendo 500 µg.mL ⁻¹ de Cabo, Cbol, Con Br e Cgra.	60
6 - Sobrevivência das ninfas de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em dieta artificial contendo 500 µg.mL ⁻¹ de CFL, Dgui, DGL, Dros, DVL e Dvir.	61
7 - Sobrevivência das ninfas de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em dieta artificial contendo 500 µg.mL ⁻¹ de APL, Bs, Bt, EPH, PPL e VML.	62
8 - Efeitos da Con Br, CFL e DVL sobre o desenvolvimento ninfal de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	63
9 - Efeitos da Con Br, CFL e DVL à doses subletais sobre o desenvolvimento ninfal de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	64
10 - Efeitos da Cabo, Cbol e Cgra sobre o desenvolvimento ninfal de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	65
11 - Efeitos da Dgui, DGL, Dros e Dvir sobre o desenvolvimento ninfal de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	66
12 - Efeitos da Bs, Bt, EPH, PPL e VML sobre o desenvolvimento ninfal de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	67
13 - Efeitos das diferentes concentrações de APL sobre o desenvolvimento ninfal de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	68
14 - Efeito da Con Br sobre a sobrevivência de adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	71
15 - Ensaio de inibição por açúcar das lectinas Con Br e Con A.	72
16 - Ensaio de inibição da atividade tóxica da Con Br à dose de 500 µg.mL ⁻¹ na sobrevivência de ninfas de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	73

17-	Análise eletroforética das proteínas de tratos digestivos de adultos de <i>Acyrtosiphon pisum</i> alimentados com dieta artificial contendo Con Br à diferentes concentrações.	74
18 -	Lectin blot de proteínas do trato digestivo de <i>Acyrtosiphon pisum</i> marcadas com lectinas conjugadas com biotina.	76
19 -	Cromatografia de afinidade em coluna de Con Br-Agarose de proteínas membranares solubilizadas do trato digestivo de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	77
20 -	Eletroforese bidimensional do pIII da Con Br-agarose.	78
21 -	Alinhamento múltiplo de uma sequência interna da aminopeptidase de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	80
22 -	Alinhamento múltiplo de quatro sequências internas de uma proteína do trato digestivo de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	82
23 -	Eletroforese em gel de agarose 1 % do gene da aminopeptidase amplificado por PCR.	84
24 -	Eletroforese em gel de agarose 1 % de plasmídeos recombinantes DH5 α expressando o gene da aminopeptidase amplificado por PCR.	85
25 -	Sequência nucleotídica parcial com sequência de aminoácidos deduzida, de uma aminopeptidase de <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	86
A1 -	Vector pTriplEx2, mapa de restrição e sitio de clonagem múltipla.	121
A2 -	Vector de clonagem pMOSBlue	122

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 - Exemplos de genes utilizados em plantas transgênicas no controle de insetos.	19
2 - Distribuição e natureza de lectinas no reino vegetal.	27
3 - Composição da dieta artificial para <i>Acyrtosiphon pisum</i>	42
4 - Toxicidade oral de lectinas expressas em IC e LC contra o <i>Acyrtosiphon pisum</i> ,	69
A1 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em função das diferentes concentrações de Con Br administradas através de dieta artificial.	111
A2 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em função das diferentes concentrações de CFL administradas através de dieta artificial.	112
A3 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em função das diferentes concentrações de DVL administradas através de dieta artificial.	113
A4 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em função das diferentes concentrações de Con Br administradas em dose subletais através de dieta artificial.	114
A5 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em função das diferentes concentrações de CFL administradas em dose subletais através de dieta artificial.	114
A6 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em função das diferentes concentrações de DVL administradas em dose subletais através de dieta artificial.	115
A7 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de <i>Acyrtosiphon pisum</i> em função das diferentes	

- concentrações de CABO administradas através de dieta artificial. 115
- A8 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Cbol administradas através de dieta artificial. 116
- A9 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de CGRA administradas através de dieta artificial. 116
- A10 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Dros administradas através de dieta artificial. 116
- A11 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Dvir administradas através de dieta artificial. 117
- A12 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Dgui administradas através de dieta artificial. 117
- A13 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de DGL administradas através de dieta artificial. 117
- A14 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de ALF administradas em dose subletais através de dieta artificial. 118
- A15 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de BS administradas através de dieta artificial. 118
- A16 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de BT administradas através de dieta artificial. 118
- A17 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de PPL administradas através de dieta artificial. 119
- A18 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao

controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes 119
concentrações de EPH administradas através de dieta artificial.

A19 - Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao 119
controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes
concentrações de VML administradas através de dieta artificial.

A20 - Lectinas utilizadas e suas características 120

A21 - Genótipo de cepas bacterianas 123

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CHAPS	3 – [(3 – cholamidopropil) dimetil-amônia] – 1 – propano – sulfonato
DEAE	Dietilaminoetil
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EGTA	Ácido etileneoglicol-bis-(etileno-diamino)-tetracético
E64	N-[N-(L-3-transcarboxirano-2-carbonil)-L-Leucil]-agmatina
IPTG	Isopropil- tio-galactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
Man	Manose
p/p	peso/peso
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoride
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris(hidroximetil) – aminometano
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino
Triton X-100	t-Octilphenoxipolietoxietanol
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactosídeo

Código para Resíduos de Aminoácidos(IUPAC, 1972):

Código de 1 letra	Nome Formal	Código de 3 letras
A	Alanina	Ala
C	Cisteína	Cys
D	Ácido Aspártico	Asp
E	Ácido Glutâmico	Glu
F	Fenilalanina	Phe
G	Glicina	Gly
H	Histidina	His
I	Isoleucina	Ile
K	Lisina	Lys
L	Leucina	Leu
M	Metionina	Met
N	Asparagina	Asn
P	Prolina	Pro
Q	Glutamina	Gln
R	Arginina	Arg
S	Serina	Ser
T	Treonina	Thr
V	Valina	Val
W	Triptofano	Trp
Y	Tirosina	Tyr

RESUMO

As espécies da subtribo Diocleinae (Fabaceae) possuem lectinas isoladas de sementes cujas propriedades estruturais e físico-químicas são bastante similares. Neste estudo, utilizamos a lectina de *Canavalia brasiliensis* (Con Br), manose/glucose específica, como ferramenta no isolamento de alvos moleculares de lectinas no trato digestivo do pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* Harris (Homoptera: Æphididae) tentando identificar possíveis receptores. Ensaio de toxicidade "in vitro" foram realizados com dezesseis lectinas, dentre elas nove da subtribo Diocleinae. A análise estatística das curvas de mortalidade e inibição do crescimento mostrou que, com exceção da lectina de *Dioclea grandiflora*, todas as outras exerceram algum efeito tóxico no desenvolvimento do inseto. Entre as mais tóxicas estão a Con Br e as lectinas de *Canavalia bonariensis*, de *C.aff.sp. boliviana*, de *Dioclea virgata* e de *D.rostrata* que, nas concentrações em torno de 100 a 122 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduziram o peso dos adultos em 50 %. Dentre as outras lectinas testadas, a de *Abrus pulchellus* destacou-se como sendo extremamente tóxica matando 100 % dos insetos no quarto dia do desenvolvimento com doses de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O Lectin Blot, com as lectinas marcadas com biotina, utilizou Con Br e as lectinas de *C.ensifomis*, de *Cratylia floribunda* e de *D.violacea* como representantes do grupo das Diocleinae, e as lectinas de *Galanthus nivalis*, de *Listera ovata* e de *Arum maculatum* das Monocotiledôneas. Várias proteínas do trato digestivo de *A.pisum* foram reconhecidas fortemente pelos dois grupos. Entretanto diferenças quantitativas foram identificadas entre os grupos e dentro do grupo das Monocotiledôneas. Através de cromatografia de afinidade em gel de Con Br-Agarose foram isoladas proteínas do trato digestivo do inseto, seguido da separação em eletroforese bidimensional sob condições desnaturantes. Uma aminopeptidase de massa molecular aparente de 120 kDa e pI 5,0 foi identificada entre as várias proteínas de membrana. A sequência nucleotídica parcial da aminopeptidase foi determinada utilizando uma biblioteca genômica construída a partir do ARN mensageiro extraído de tratos digestivos do *A.pisum*. O envolvimento da aminopeptidase nos efeitos tóxicos exercidos pelas lectinas acima mencionadas são discutidos nesta Tese.

ABSTRACT

Lectins isolated from Diocleinae (Fabaceae) subtribe seeds present very similar structural and physicochemical properties. In this Thesis, we used the mannose/glucose-specific *Canavalia brasiliensis* (Con Br) lectin as a tool to isolate and identify molecular targets for lectins in the digestive tract of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris (Homoptera: Aphididae). In vitro toxicity assays were performed with 16 lectins including 9 from the Diocleinae subtribe. Statistical analysis of the mortality and growth inhibition curves show that all the Diocleinae lectins, with the exception of *Dioclea grandiflora*, exert toxic effects on the development of the insect. Con Br and lectins from *Canavalia bonariensis*, *C. aff. sp. boliviana*, *Dioclea virgata* and *D. rostrata* were found to be the most toxic ones, decreasing the average weight of the adult insects by 50 % in concentrations ranging from 100 to 122 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The lectin from *Abrus pulchellus* was found to be extremely toxic, being able to kill 100% of the insects at their fourth day of development at a low dose (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Lectin blot assays were performed on aphid gut protein extracts using biotin-labeled lectins from the Diocleinae group, such as Con Br, and lectins from *C. ensiformis*, *Cratylia floribunda* and *D. violacea*, and from monocotyledon group, such as from *Galanthus nivalis*, *Listera ovata* and *Arum maculatum*. Several proteins from the digestive tract of *A. pisum* were strongly recognized by both lectin groups. Moreover, quantitative differences were observed between groups and also within the monocotyledons group. Several proteins from the digestive tract of the insect were isolated by means of gel affinity chromatography, with Con Br-Agarose, followed by non-native two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Further studies performed on the isolated proteins allowed us to identify an aminopeptidase of apparent molecular weight 120 kDa and pI 5.0. Its partial nucleotide sequence was determined using a genomic library constructed from messenger RNA extracted from *A. pisum* digestive tract. The role of the aminopeptidase in the toxic effects exerted by the abovementioned lectins is discussed in this Thesis.

1 – INTRODUÇÃO

A produção de alimentos em quantidade suficiente para atender a demanda mundial constitui um dos mais graves problemas da atualidade. Dentre os fatores que contribuem para as maiores perdas na agricultura, encontram-se as pragas, as ervas daninhas e as doenças vegetais. No combate as pragas, os pesticidas foram, primariamente, a principal e única forma de controle. Durante muitos anos o uso quase que exclusivo em algumas áreas levou a evolução de raças resistentes. Numa tentativa de contornar o problema, métodos alternativos como o controle biológico e a utilização de plantas transgênicas vêm sendo incorporados a realidade do campo.

As primeiras referências sobre plantas transgênicas resistentes a insetos, datam de 1987 (HILDER *et al.*, 1987; VAEK *et al.*, 1987). A partir de então com o desenvolvimento tecnológico, atingimos em 1998 a marca aproximada de 40 diferentes genes incorporados a grandes culturas, conferindo-lhes resistência a insetos (TABELA 1). Esta nova tecnologia oferece vantagens sobre o uso convencional de inseticidas químicos, como biodegradabilidade e redução na exposição a produtos químicos.

Os genes de resistência transferidos a vegetais têm como alvo o sistema digestivo de insetos. A maioria deles origina-se de bactérias ou plantas superiores. Recentemente, genes de resistência de origem animal e outros microorganismos têm sido introduzidos.

Dentre as bactérias, os esporos e cristais de proteínas de várias cepas do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) têm sido utilizados como inseticidas desde os anos 50. O *Bt* é uma bactéria do solo que produz cristais de proteínas, denominados de toxinas *Bt*, δ -endotoxinas ou proteínas cristais, dentro de suas células durante o processo de esporulação. As toxinas *Bt* utilizadas na transgênese vegetal são: cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ba, cry1Ca, cry1H, cry2Aa, cry3A, cry6A e cry9C (SCHNEPF *et al.*, 1998).

TABELA 1. Exemplos de genes utilizados em plantas transgênicas no controle de insetos.

GENES DE RESISTÊNCIA	INSETO ALVO	PLANTAS TRANSFORMADAS
<u>Toxinas Bt</u>		
Cry1Aa	Lepidoptera	Álamo
Cry1Ab	Lepidoptera	Maça, algodão, milho, álamo, batata, arroz, tabaco, tomate, trevo branco, abeto branco
Cry1Ac	Lepidoptera	Maça, brócolis, algodão, arroz, soja, tabaco, tomate, noz. Trevo branco
Cry1Ba	Lepidoptera	Alfafa, <i>Arabidopsis</i> , tabaco
Cry1Ca	Lepidoptera	Milho
Cry1H	Lepidoptera	Algodão
Cry2Aa	Lepidoptera	Batata, tabaco
Cry3A	Coleoptera	Alfafa
Cry6A	Coleoptera	Milho
Cry9C	Lepidoptera	Pêra, cana-de-açúcar
Bt (não determinado)		
<u>Inibidores de Proteases</u>		
C-II (Inib. de serina protease da soja)	Coleoptera, Lepidoptera	Nabo, álamo, batata, tabaco
CMe (Inibidor de tripsina da cevada)	Lepidoptera	Tabaco
CMTI (Inibidor de tripsina da abóbora)		Tabaco
CpTI (Inibidor de tripsina do feijão)	Coleoptera, Lepidoptera	Maça, alface, nabo, batata, arroz, girassol, tabaco, tomate
14K-CI (Inib. de serina protease e α -amilases de cereais)		Tabaco
MTI-2 (Inib. de serina prot. da mostarda)	Lepidoptera	<i>Arabidopsis</i> , tabaco
OC-1 (Inib. de cisteína protease do arroz)	Coleoptera, Homoptera	Nabo, álamo, tabaco
PHV (Inib. de serina protease da soja)	Lepidoptera	Batata, tabaco
Pot PH (Inib. de protease da batata I)	Lepidoptera, Orthoptera	Petúnia, tabaco
Pot PT-II (Inib. de protease da batata II)	Lepidoptera, Orthoptera	Bétula, alface, arroz, tabaco
Inibidor de protease I	Lepidoptera	Nabo
Inibidor de tripsina da soja	Lepidoptera	Batata, tabaco
Inibidor de protease do tomate I	Lepidoptera	Alfafa, , tabaco e tomate
Inibidor de protease do tomate II	Lepidoptera	Tabaco, tomate
<u>Inibidores de α-Amilases</u>		
Inib. de α -amilase de <i>P. vulgaris</i> (α AI-Pv)	Coleoptera	Feijão, ervilha e tabaco
Inib. de α -amilase de cereais (WMAI-1)	Lepidoptera	Tabaco
14K-CI		Tabaco
<u>Lectinas</u>		
GNA	Homoptera, Lepidoptera	Uva, nabo, batata, arroz, cana-de-açúcar, girassol, tabaco, tomate
Lectina de ervilha (p-lec)	Homoptera, Lepidoptera	Batata, tabaco
Lectina de germe de trigo (WGA)	Lepidoptera, Coleoptera	Milho
Jacalina	Lepidoptera, Coleoptera	Milho
Lectina de arroz	Lepidoptera, Coleoptera	Milho
<u>Outros</u>		
Quitinase do feijão (BCH)	Homoptera, Lepidoptera	Batata
Peroxidase aniônica do tabaco	Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera	Tabaco e tomate
Quitinase do tomate		Nabo
Descarboxilase de <i>Catharanthus roseus</i> (TDC)	Homoptera	Tabaco

Fonte: SCHULER *et al.*, 1998

As plantas naturalmente possuem um certo grau de resistência a insetos, permitindo que somente um número limitado de herbívoros consiga alimentar-se de uma espécie vegetal. Esta resistência inerente é baseada em vários mecanismos de defesa, incluindo um largo espectro de compostos secundários produzidos pelo vegetal. Entre os inúmeros compostos secundários utilizados como fatores de resistência, destacaram-se: os inibidores de enzimas digestivas (proteases e α -amilases) e as lectinas.

Os efeitos deletérios de inúmeras lectinas em insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera, Homoptera e Diptera têm sido investigados e comprovados, porém, o modo de ação deste grupo de proteínas continua pouco esclarecido. Isto entretanto não impediu o grande interesse por lectinas, como a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), tóxica para pragas importantes como afídeos e uma importante praga do arroz, *Nilaparvata lugens* (POWELL *et al.*, 1995a; DOWN *et al.*, 1996).

1.1 - INSETOS

Os insetos são os organismos mais variados da terra, constituindo aproximadamente 72% de todos os animais. Estima-se que a metade deles sejam espécies fitófagas (DALY *et al.*, 1978) pertencentes as ordens Isoptera, Dermaptera, Plecoptera, Orthoptera, Phasmatodea, Hemiptera, Homoptera, Thysanoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera.

Sabe-se que nenhuma espécie vegetal em seu meio ambiente é atacada por todas as espécies de insetos, e não é comum que um inseto, em seus limites geográficos, se alimente indiscriminadamente de todas as plantas (THORSTEINSON, 1960). Simples observações demonstraram que os insetos vivem associados com certas partes ou espécies de plantas (DETHIER, 1976) e, assim, são conhecidos por nomes comuns, em inúmeros exemplos, como o curuquerê dos capinzais (*Mocis latipes*, Lepidoptera: Noctuidae), o pulgão dos cereais (*Schizaphis graminum*, Homoptera: Aphididae), a broca da raiz do algodoeiro (*Eutinobothrus brasiliensis*, Coleoptera: Curculionidae) ou a lagarta do algodoeiro (*Heliothis virescens*, Lepidoptera: Noctuidae) (GALLO *et al.*, 1978).

A subordem Homoptera, pertencente a ordem Hemiptera, é composta de cerca de 35000 espécies de insetos terrestres e sugadores de seiva com tamanho variável. Nesta subordem encontram-se insetos conhecidos como cigarras, cigarrinhas, pulgões e cochonilhas. A família Aphididae compreende os pulgões. Largamente espalhados pelo mundo, os pulgões disseminaram-se paralelamente as Angiospermas, onde a maioria das espécies é hospedeira destes insetos. É portanto na zona temperada onde encontram-se em maior variedade, entretanto, estão igualmente espalhados pela zona tropical e subártica. Contam com as seguintes espécies mais importantes no Brasil: *Aphis gossypii*, que ataca principalmente malváceas e cucurbitáceas; *Toxoptera citricidus*, em citros; *Brevicoryne brassicae* (L.), o pulgão da couve e outras crucíferas; e, *Macrosiphum rosae* (L.), em rosáceas. Na Europa e América do Norte destacam-se: o pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum*, o pulgão do pêssigo, *Mizus persicae*; o pulgão da batata, *Aulacorthum solani*; o *Aphis gossypii* que nesta região ataca preferencialmente melão e pepino, entre outros.

1.1.1 - *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae)

O pulgão da ervilha é uma praga de grande importância econômica nas zonas temperadas. Sua importância agrícola deve-se, em grande parte, a alta taxa de reprodução que, sob condições ambientais favoráveis, leva a sérias perdas na produção agrícola. Coloniza preferencialmente as tribos de leguminosas: Genisteae (*Cytisus*, *Genista*, *Sarothamnus*, *Spartium*), Trifoleae (*Medicago*, *Melilotus*, *Ononis*, *Trifolium*, *Trigonella*), Viceae (*Lathyrus*, *Lens*, *Pisum*, *Vicia*), Hedysareae (*Hippocrepis*, *Onobrychis*), e também coloniza alguns membros de outras tribos, como é o caso dos gêneros *Lotus* (Loteae), *Astragalus* (Galageae) e *Glycinae* (Phaseoleae).

Este inseto foi escolhido como objeto de estudo por ser uma espécie muito analisada quanto as suas características fisiológicas, sendo modelo de estudos de nutrição do laboratório *Biologie Fonctionelle, Insectes et Interactions* (BF2I) a mais de 10 anos.

a - Morfologia e anatomia

Os pulgões possuem o corpo segmentado e o esqueleto externo formado por uma cutícula rígida, o que impede o crescimento progressivo e os faz passar por estágios de crescimento sucessivos (estágios ninfares) livrando-se do exoesqueleto cada vez que este torna-se pequeno (fenômeno da muda). Eles medem entre 2,3 a 4,4 mm e existem em duas formas adultas: alados e ápteros. Em seus estágios ninfares assemelham-se aos adultos, com exceção da ausência de asas (FIGURA 1a). As ninfas têm o mesmo modo de vida dos adultos, alimentam-se da mesma maneira e provocam os mesmos danos.

Quanto a alimentação, são exclusivamente fitófagos possuindo um sistema bucal do tipo sugador. As peças bucais são transformadas e adaptadas à retirada do alimento líquido não disponível na superfície. As mandíbulas e os maxilares têm a forma de estiletes que se unem em toda sua extensão, formando um feixe com canais salivares e alimentares (FIGURA1b).

O trajeto dos estiletes no vegetal é geralmente intercelular, algumas vezes intracelular. A medida que o pulgão injeta seus estiletes na planta, ele libera uma saliva que diseca o tecido vegetal formando um canal rígido, no interior desta, no qual o inseto pode manobrar seus estiletes, retirá-los se for importunado e efetuar uma nova injeção.

b - Danos e controle

O modo de nutrição dos pulgões provoca alguns tipos de conseqüências na planta:

- A saliva secretada provoca freqüentemente uma reação do vegetal como a formação de galhas e o engruvinhamento de folhas;
- A emissão da saliva ou o simples fato de penetrar os estiletes na planta, pode ser a ocasião de transmissão de vírus. O pulgão da ervilha é vetor de mais de 30 vírus, incluindo vírus não-persistentes de feijões, ervilhas, trevos, cucurbitáceas, *Narcissus* e crucíferas;

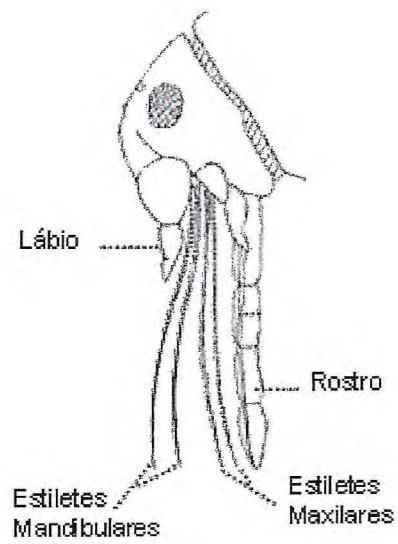


FIGURA 1. Afídeos, fases ninfais (a) e peças bucais (b).

- Os pulgões sugam a seiva elaborada, usufruindo dos aminoácidos essenciais à planta e a infestação massiva pode provocar uma parada no crescimento vegetal;
- Os produtos não assimilados ou transformados pelo inseto são excretados através do ânus, geralmente na face inferior das folhas. Estas substâncias açucaradas podem cobrir os estômatos provocando uma perda de água vegetal e/ou também, promover o desenvolvimento de organismos saprófitas.
- Os pulgões também podem favorecer a proliferação de doenças fúngicas, ao transportar os esporos ou ao capturá-los com a ajuda das substâncias açucaradas depositadas sob as folhas.

Os pesticidas foram primariamente a principal forma de controle. Atualmente o controle biológico de pragas, incluindo o uso de fungos que parasitam naturalmente o pulgão da ervilha (GUTIERREZ & PICKERING, 1991) e o emprego de parasitóides (MERTINS, 1985), destacam-se como uma forma alternativa de controle.

1.2 - LECTINAS VEGETAIS

1.2.1 - Definição e Considerações Gerais

Segundo Peumans e Van Damme (1995), as lectinas podem ser definidas simplesmente como proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que liga-se específica e reversivelmente a monossacarídeos ou oligossacarídeos. De acordo com esta definição, elas são classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas são proteínas constituídas por um único sítio de ligação a carboidratos e, portanto, incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. As hololectinas, de estrutura mais complexa, possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, assim denominadas de hemaglutininas. No

terceiro grupo denominado quimerolectinas, encontramos um ou mais domínios, que ligam-se a carboidratos como as mero e hololectinas, e de um domínio catalítico apresentando outra atividade biológica, como é o caso das RIPs tipo 2 (proteínas inativadoras de ribossomos). No quarto e último grupo denominado de superlectinas encontramos proteínas que consistem no mínimo de dois sítios de ligação a carboidratos não relacionados, como exemplo a lectina de tulipa com um domínio N-terminal para manose e um segundo domínio específico para N-acetil-galactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1996).

As lectinas têm sido detectadas em mais de 1000 espécies vegetais. De acordo com suas características estruturais e funcionais, elas podem ser separadas em seis grupos principais: lectinas tipo Jacalina, lectinas de Amarantina, lectinas de monocotiledôneas, lectinas do floema de Cucurbitáceas lectinas específicas para quitina e RIPs tipo 2 (TABELA 2) (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

O grupo Amarantina compreende as lectinas da família Amaranthaceae, e também é o nome comum da aglutinina de *Amaranthus caudatus* (ACA) uma proteína homodimérica com especificidade para antígenos-T (RINDERLE *et al.*, 1989).

As lectinas de cucurbitáceas são proteínas específicas por N-acetil-glicosamina encontradas exclusivamente no floema de espécies dos gêneros *Citrullus*, *Coccinia*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Luffa* e *Sechium*. Possuem

No grupo das lectinas específicas por quitina destacam-se as lectinas possuidoras de pelo menos um domínio heveína (RAIKHEL *et al.*, 1993; VAN DAMME *et al.*, 1998). Este é definido como uma unidade estrutural semelhante a heveína, uma proteína de 43 resíduos de aminoácidos que reconhece quitina e é originária do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). As lectinas de gérmen de trigo (WGA), *Urtica dioica* (UDA) e *Sambucus nigra* estão entre as lectinas deste subgrupo (PEUMANS *et al.*, 1982; PEUMANS *et al.*, 1984, BROKAERT *et al.*, 1984).

As RIPs tipo 2, conhecidas por serem citotóxicas, são uma classe especial de quimerolectinas compostas de duas cadeias (α e β). A cadeia β , onde encontra-se o sítio de ligação a carboidratos, é responsável pela ligação da molécula a receptores glicosilados na superfície celular, introduzindo a cadeia α no meio citosólico onde será responsável pela inativação de ribossomos através da clivagem

da ligação N-glicosídica de um único resíduo de adenina do rRNA, impedindo a síntese de proteínas (HAUSNER *et al.*, 1987).

O grupo das leguminosas possui o maior número de lectinas isoladas e bem caracterizadas. A família Leguminosae subdivide-se em três subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae. A subfamília Papilionoideae destaca-se com o maior número de lectinas isoladas distribuídas entre as tribos Sophoreae (subtribo Sophora), Robineae e Phaseoleae (subtribos Erythrinae, Glycininae, Diocleinae e Phaseolinae). (RAMOS, 1997).

1.2.2 - Lectinas da Subtribo Diocleinae

As lectinas de sementes da subtribo Diocleinae (Leguminosae) são proteínas compostas de uma única cadeia polipeptídica, com massa molecular em torno de 26 kDa, que interagem especificamente com resíduos de glicose/manose componentes de glicoconjugados (MOREIRA *et al.*, 1991). Distribuídas entre os gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* as lectinas dessa subtribo têm sido muito estudadas quanto as suas propriedades moleculares e funcionais.

A lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A), uma das lectinas melhor caracterizadas, é sintetizada durante o processo de maturação da semente, acumulando-se nos corpos protéicos das células de reserva do parênquima cotiledonar (MARCUS *et al.*, 1984; HERMAN *et al.*, 1985). A lectina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso na forma de uma pré-pro-proteína, que possui um peptídeo sinal de 29 aminoácidos na porção N-terminal, o qual é removido durante a tradução e a interiorização da cadeia polipeptídica no lúmen do retículo endoplasmático. Ao mesmo tempo, um oligossacarídeo rico em manose e de massa molecular equivalente a do peptídeo sinal perdido, é adicionado à porção mediana da proteína por ligação covalente ao resíduo de asparagina 153, produzindo desta forma o precursor glicosilado pro-Con A, cuja subunidade tem uma massa molecular aparente de 34 kDa (HERMAN *et al.*, 1985; CHRISPEELS *et al.*, 1986). A pro-Con A é transportada através do aparelho de Golgi para os corpos protéicos, onde é processada pela perda do oligopeptídeo central. Os dois polipeptídeos resultantes (α

TABELA 2. Distribuição e natureza de lectinas no reino vegetal.

Grupo	Ocorrência		Estrutura Molecular		
	Distribuição taxonômica	nº aprox. de lectinas	Protômeros (kDa)	nº de Protômeros	Especificidade
Amarantina	Amaranthaceae	<10	30	2	Gal NAc
Espécificas por quitina					
Classe I – quitinases	ubíqua	>50	30	1	(GlcNAc) _n
Gramíneas	Gramineae	>10	18 ou (10+8)	2	Glc NAc
Domínio Heveina	variada	<5	5	1	(GlcNAc) _n
Phytolacca	<i>Phytolacca</i> sp.	<10	10, 15, 25, 35, 30	2	(GlcNAc) _n
Solanáceas	Solanaceae	<10	10	2	(GlcNAc) _n
Outras	variada	<5		1 ou 2	(GlcNAc) _n
Lectinas do floema de Cucurbitáceas	Cucurbitaceae	<10	25	2	(GlcNAc) _n
Lectinas tipo Jacalina					
Moráceas	Moraceae	<10	(14 + 2)	4	Gal/ GalNAc
Manose específicas	Monocotiledôneas e dicotiledôneas	<10	16	2 ou 4	Manose/maltose
Leguminosas	Leguminosae	>100	30 ou [(30-x) +x]	2 ou 4	Manose/glicose Fucose; Gal/GalNac (GlcNAc) _n ; Ácido Siálico; Complexo
Monocotiledôneas específicas por manose	Liliaceas, Araceae, Orchidaceae, Bromeliaceae	>100	12 ou 30 ou [(30-x) +x]	1, 2, 3 ou 4	Manose
RIP's tipo 2	Monocotiledôneas e dicotiledôneas	>20	[30-s-s-35]	1, 2 ou 4	Gal/GalNac ou Siaα2-6gal/GalNac

Fonte: Peumans & Van Damme, 1998

e β) sofrem uma transposição e são então religados, produzindo a forma madura não-glicosilada. A presença do oligossacarídeo rico em manose é essencial para o transporte da pro-Con A do retículo endoplasmático para os corpos protéicos, via complexo de Golgi (FAYE *et al.*, 1987). Os fragmentos denominados α e β são encontrados em todas as lectinas de Diocleinae, sugerindo o mesmo mecanismo de síntese de proteínas (RAMOS *et al.*, 1997).

Quanto à estrutura, estas lectinas contém íons metálicos (Ca^{+2} e Mn^{+2}) ligados a cada subunidade, o que vêm sendo demonstrado ser essencial no estabelecimento do sítio de ligação a carboidratos. A presença de sítios hidrofóbicos também tem sido relatada, podendo ocorrer tanto em uma única subunidade como se estabelecer no centro da proteína. Os resíduos de aminoácidos envolvidos na formação do sítio de ligação a metais e do sítio hidrofóbico têm sido bem conservados durante a evolução (PUSZTAI, 1991; KONAMI *et al.*, 1991; CAVADA *et al.*, 1993).

A especificidade fina por carboidratos e a elucidação das estruturas quaternárias das lectinas da subtribo Diocleinae vêm sendo bastante estudadas nos últimos anos. Em 1998, Dam e colaboradores determinaram que 9 lectinas desta subtribo, dentre elas Con A e Con Br (*Canavalia brasiliensis*), conservam os sítios de ligação para monodeoxi e tetradeoxi análogos ao trimanossídeo, 3,6-di-O-(α -D-mannopiranosyl)-D-manose presente em todos os carboidratos que ligam-se a asparagina. Além disto, observaram que suas especificidades são distintas para um complexo biantenário (manotriose bis N-acetil glucosamil) e/ou estruturas homólogas. Somente Con Br, Con A, Dgui (*Dioclea guianensis*) e Dvir (*D. virgata*) são inibidas por este carboidrato enquanto Cbon (*C. bonariensis*), CFL (*Cratylia floribunda*), Dros (*D. rostrata*) e DGL (*D. grandiflora*) necessitam de quantidades acima de 0,4 mM para terem sua atividade hemaglutinante inibida quando frente a eritrócitos de coelho não-tratados.

Estas proteínas são encontradas na forma de dímeros e/ou tetrâmeros homogêneos de acordo com o pH do meio, o que varia de proteína para proteína. A Con A, por exemplo, encontra-se preferencialmente como dímero a pH 5,0 (AGRAWAL *et al.*, 1968 apud CALVETE *et al.*, 1999) e como tetrâmero a pH $\geq 7,0$ (KALB & LUSTIG, 1968 apud CALVETE *et al.*, 1999). As lectinas de *C. floribunda*, *D. rostrata* e *D. virgata* formam tetrâmeros a pH $\geq 6,5$, e *D. grandiflora* e *D. violacea* acima do pH 5,5. Entretanto, as lectinas de *D. guianensis*, *C. bonariensis* e Con Br

apresentam um equilíbrio dímero/tetrâmero no pH 8,5. O interessante é observar que pequenas diferenças nas seqüências primárias de lectinas como a Con A e a Con Br, que diferem entre si em apenas 2 resíduos de aminoácidos, possam alterar o equilíbrio dímero/tetrâmero modificado e uma estrutura quaternária distinta (CALVETE *et al.*, 1999).

Estas diferenças estruturais talvez possam explicar juntamente com a especificidade fina por oligossacarídeos, as diferentes atividades biológicas atribuídas as lectinas de Diocleinae, como a diferenciação na estimulação da proliferação de linfócitos e Interferon gamma (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), na estimulação de macrófagos e reação inflamatória (RODRIGUES *et al.*, 1992), na indução do edema de pata e migração peritoneal de células (BENTO *et al.*, 1993), na liberação de histamina (FERREIRA *et al.*, 1996) e na indução da produção de óxido nítrico "in vitro" e "in vivo" em ratos (ANDRADE *et al.*, 1999).

1.2.3 - Lectinas da Super Família Monocotiledônea

As lectinas de monocotiledôneas estão distribuídas em 5 famílias principais: Amaryllidaceae, Alliaceae, Araceae, Orchidaceae e Liliaceae. A primeira lectina deste grupo a ser isolada foi a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA, Amaryllidaceae) (VAN DAMME *et al.*, 1987). A partir de então várias lectinas têm sido isoladas e estudadas intensivamente nos últimos anos. As lectinas desta super família possuem como característica principal a especificidade restrita por resíduos de manose e atividades anti-virais (BALZARINI *et al.*, 1992).

Encontradas em tecidos vegetais variados como folhas, ovários, bulbos, tubérculos, rizomas, raízes e até no néctar, somente não têm sido detectadas em sementes (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Normalmente estas lectinas não estão confinadas a um único tecido, também encontram-se espalhadas pela planta, com exceção de *Allium sativum* que expressa duas lectinas específicas para o tubérculo e a folha (SMEETS *et al.*, 1994).

As diferenças na especificidade fina por carboidratos têm sido constatadas. A GNA liga-se preferencialmente a $\text{Man}\alpha 1\text{-3Man}$ (SHIBUYA *et al.*, 1988), enquanto as lectinas de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA) e *Listera ovata*

(LOA) possuem maior especificidade por $\text{Man}\alpha 1\text{-6Man}$ e $\text{Man}\alpha 1\text{-2Man}\alpha 1\text{-3Man}$, respectivamente (KAKU *et al.*, 1990; SAITO *et al.*, 1993).

Com relação as características estruturais das lectinas de monocotiledôneas, estas são subdivididas em dois subgrupos. O primeiro subgrupo compreende as proteínas com um domínio de massa molecular de 11 a 14 kDa e o segundo contém dois domínios de 25 a 30 kDa. Com exceção da lectina de folhas de *Listera ovata* e de *Epipactis helleborine*, as proteínas com um domínio comportam-se como homodímeros ou homotetrâmeros através de interações não covalentes (VAN DAMME *et al.*, 1994). Deve-se ressaltar que as lectinas homooligoméricas são sintetizadas como pré-pro-proteínas, as quais são convertidas em lectina madura através de uma clivagem co-traducional do peptídeo sinal e pós-traducional do peptídeo C-terminal (VAN DAMME *et al.*, 1988; VAN DAMME *et al.*, 1991).

Análises bioquímicas e moleculares têm mostrado que essas lectinas são correlacionadas estruturalmente. Hester e colaboradores (1995) mostraram que a GNA é um tetrâmetro composto de subunidades idênticas. Cada domínio consiste de 3 subdomínios com cerca de 40 aminoácidos similares em suas seqüências internas, os quais correspondem aos três sítios de ligação a carboidratos (HESTER *et al.*, 1995).

1.2.4 - Atividade Inseticida de Lectinas

Há algum tempo as lectinas vêm sendo implicadas na defesa vegetal contra o ataque de microorganismos e predadores. A detecção de lectinas na superfície extracelular de tecidos vegetais considerados sítios de infecção em potencial, foi um dos primeiros indícios a sugerir uma função exógena. Suposições a parte, nos últimos 20 anos muitas publicações vêm contribuindo para a elucidação de uma das questões mais discutidas, o papel desempenhado pelas lectinas nos vegetais.

A capacidade de se ligar a carboidratos, explica em parte a denominação de lectinas como mediadoras numa variedade de processos biológicos como por exemplo, o transporte de carboidratos em sementes, a interação entre

leguminosas e nematóides e a inibição no crescimento de fungos e insetos (REEKE & BECKER, 1988; DIAZ *et al.*, 1989; CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

Uma das primeiras determinações da atividade inseticida de lectinas, refere-se a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) a qual adicionada a dieta de *Callosobruchus maculatus*. (Coleoptera: Bruchidae) era letal ao inseto (Jenzen, 1976). Posteriormente, Gatehouse e colaboradores (1984) confirmaram este resultado e também demonstraram que a PHA liga-se ao epitélio digestivo do gorgulho. Entretanto, Huesing e colaboradores (1991c) revelaram que um inibidor de α -amilase presente nas sementes de *Phaseolus vulgaris* era o verdadeiro princípio tóxico nesta preparação.

Já Shukle e Murdock (1983), trabalharam com uma preparação lectínica livre de contaminações, e determinaram que a lectina de soja quando adicionada a uma dieta artificial na concentração de 1 % é capaz de retardar o crescimento e o desenvolvimento de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae).

Alguns anos mais tarde Murdock e colaboradores (1990) analisaram os efeitos biológicos de lectinas vegetais puras sobre o gorgulho do feijão, *C. maculatus* F. Dentre as 17 lectinas testadas, somente 5 causaram alterações significativas no tempo de desenvolvimento do gorgulho quando da administração em dieta artificial nas concentrações de 0,2 e 1,0 % (p/p). A mais potente foi a aglutinina de germe de trigo (WGA), específica para N-acetil-glucosamina. Sabendo-se que a WGA isolada do trigo hexaplóide é composta por seis isolectinas, Huesing e colaboradores (1991a) estudaram os efeitos das três isolectinas homodiméricas que compõem esta mistura e não observaram diferenças em suas atividades. Assim como a WGA, outras lectinas específicas por N-acetil-glucosamina têm sido citadas como tóxicas ao *C. maculatus*, como as lectinas de *Oryza sativa* (OSA) e *Urtica dioica* (UDA) (HUESING *et al.*, 1991b).

Um dos primeiros trabalhos com insetos da subordem Homoptera, analisou os efeitos de três lectinas específicas para manose em ninfas do terceiro instar de *Nilaparvata lugens* (Delphacidae). A GNA apresentou-se como a mais tóxica comparada as lectinas de *Narcissus pseudonarcissus* e *Allium sativum* (ASA). Já duas lectinas específicas para N-acetil-glucosamina também testadas, OSA (*Oryza sativa* agglutinin) e UDA (*Urtica dioica* agglutinin) não demonstraram efeito anti-metabólico (POWELL *et al.*, 1995a). Em trabalho posterior, a GNA juntamente com a WGA e a lipoxigenase da soja (LPO) reduziram a excreção de exudatos

durante as 24 horas iniciais após o que o inseto pareceu tornar-se tolerante à dieta contendo lectina (POWELL *et al.*, 1995b).

Os efeitos de lectinas sobre o pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum*, foram inicialmente determinados por Rahbé e Febvay (1993). Neste trabalho observou-se que a Con A, entre outras proteínas, possui uma atividade tóxica significativa sendo capaz de inibir com uma dose de $182 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 50 % o crescimento de larvas de *A.pisum*. Posteriormente, num levantamento com 32 lectinas, Rahbé e colaboradores (1995) identificaram as lectinas de *Ricinus communis*, *Amaranthus caudatus* (ACA) e GNA como também tóxicas ao *A.pisum*. Quando a Con A foi testada contra 6 espécies de afídeos, o *A.pisum* mostrou-se como a espécie mais susceptível dentre elas enquanto a GNA foi mais tóxica para o pulgão do pêssego, *Mizus persicae* (SAUVION *et al.*, 1996).

Além de tóxica para insetos da subordem Homoptera, a GNA também causa efeitos deletérios em insetos da ordem Lepidoptera como é o caso das larvas da mariposa do tomate, *Lacanobia oleracea*. Quando incorporada a dieta artificial na concentração de 2 % (p/p), a GNA reduz de forma significativa o crescimento e o desenvolvimento larval, assim como o consumo alimentar (FITCHES *et al.*, 1997).

Os efeitos de 25 lectinas vegetais pertencentes a 15 diferentes famílias e especificidades por carboidratos, foram analisados sobre a maior praga do *Phaseolus vulgaris* na África e Ásia, a *Maruca vitrata* F. (Lepidoptera: Pyralidae). Utilizando-se uma dieta artificial contendo 2 % (p/p) de lectina, foram observadas a sobrevivência larval, a inibição do crescimento e da alimentação, a pupação, a emergência dos adultos e fecundidade. Dentre todas as proteínas, 16 (dezesesseis) lectinas apresentaram-se tóxicas, mas somente LOA e GNA, específicas para manose, foram efetivas nos seis parâmetros estudados (MACHUKA *et al.*, 1999).

1.2.5 - Localização dos Sítios de Ligação das Lectinas em Insetos

Muito pouco é conhecido sobre os efeitos subcelulares de lectinas vegetais em insetos, assim como a localização e a estrutura dos sítios de ligação. Em 1991, Chrispeels e Raikhel sugeriram que o efeito deletério das lectinas seja o

resultado da sua ligação à quitina da membrana peritrófica do trato digestivo de larvas de Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Anteriormente, Gatehouse e colaboradores (1984) demonstraram que a PHA, ao ser ingerida pela larva do gorgulho do feijão, ligava-se as células do epitélio digestivo do inseto. Sugeriram, assim, que o mecanismo de toxicidade de lectinas em insetos seria similar ao que ocorre em ratos, ou seja, disrupção das células epiteliais do trato digestivo impedindo o transporte e absorção de nutrientes.

Eisemann e colaboradores (1994) identificaram três efeitos da WGA, Con A e lectina de lentilha sobre as larvas de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). Primeiro, as lectinas estudadas ligavam-se as células do estômago e a membrana peritrófica. Segundo, a permeabilidade da membrana peritrófica e a ingestão de dieta pela larva eram reduzidas. E terceiro, nenhum sinal de dano foi observado nas células epiteliais.

Sauvion (1995) estudou o modo de ação da Con A sobre o afídeo da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). Ao realizar cortes histológicos transversais em larvas após terem ingerido Con A marcada com FITC, observou que esta proteína fixa-se unicamente ao estômago do pulgão. Em um ensaio "in vitro" realizado por Harper e colaboradores (1995), a WGA e a lectina de *Bauhinia purpurea* L. ligam-se a proteínas de microvilosidades da borda em escova (BBM) de *Ostrinia nubilalis* e *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte.

Os efeitos subcelulares da PHA em *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) foram estudados por Habibi e colaboradores (1998). A lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) é formada por dois tipos de subunidades denominadas E (31,7 kDa) e L (29,9 kDa), as quais associam-se em várias proporções dando origem a 5 isolectinas tetraméricas: E₄, E₃L, E₂L₂, EL₃ e L₄ (FELSTED *et al.*, 1981, SHARON & LIS, 1989). Em ensaios prévios de toxicidade, a subunidade PHA-E apresentou-se mais tóxica que a PHA-L e, através de diferentes métodos como imunofluorescência, autoradiografia e imunoeletromicroscopia, pode-se observar que a PHA-E causa séria disrupção, desorganização e alongação de BBM, assim como o aumento das células epiteliais no lúmen do intestino levando ao fechamento do mesmo. Além disto, PHA-E estimula a divisão do núcleo das células epiteliais do estômago em dois, levando posteriormente a sua alongação e degradação. Em contraste, a PHA-L liga-se fracamente a superfície das células epiteliais causando menos disrupção a BBM. Em trabalho posterior, Habibi e colaboradores (2000) observaram os mesmos

efeitos da PHA no trato digestivo de *Lygus hesperus* (Hemiptera: Heteroptera), mostrando que a PHA liga-se preferencialmente as áreas mais afetadas podendo até mesmo sofrer endocitose.

Quanto a GNA e a Con A, ao serem administradas em dieta semi-artificial, alteram as atividades de enzimas solúveis e membranares do trato digestivo da mariposa do tomate, *Lacanobia oleracea*. A curto prazo, as duas lectinas aumentam o nível de proteína no trato digestivo e a atividade de uma aminopeptidase de BBM. Enzimas tipo tripsina são o principal componente do trato digestivo de larvas de Lepidoptera, com a presença da GNA e Con A na dieta alimentar de *L.oleracea* ocorre um aumento da atividade tripsínica. As duas lectinas são capazes de ligar-se "in vitro" a várias proteínas de membrana do trato digestivo do inseto e também de acumular-se nos tecidos após a exposição crônica "in vivo", entretanto Con A acumula-se em níveis maiores quando comparada a GNA (FITCHES & GATEHOUSE, 1998).

Também foi observado em *Nilaparvata lugens* que a GNA além de ser tóxica liga-se a proteínas de membranas do trato digestivo, o que levou a Du e colaboradores (2000) a identificar e purificar uma dessas proteínas reconhecidas pela GNA, como sendo uma ferritina de massa molecular aparente de 26 kDa proteína esta importante no armazenamento e transporte de ferro nos insetos (LOCKE & NICHOL, 1992 apud DU *et al.*, 2000).

1.3 - OBJETIVO

1.3.1 - Objetivo Geral

Identificar o(s) possível(is) sítio(s) de ação de uma família de genes que conferem resistência as plantas contra o pulgão da ervilha (*Acyrtosiphon pisum* Harris), utilizando a lectina de *Canavalia brasiliensis* (Con Br) como ferramenta.

1.3.2 - Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a atividade tóxica de lectinas vegetais ao *A.pisum*;
- b) Identificar o(s) alvo(s) molecular(es) das lectinas da subtribo Diocleinae e de monocotiledôneas manose específicas em *A.pisum*;
- c) Caracterização molecular e clonagem de um dos alvos moleculares do trato digestivo de *A.pisum*.

2 - MATERIAIS

2.1 - LECTINAS

As lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia sp. Aff. boliviana*, *C. bonariensis*, *C. grandiflora*, *Dioclea grandiflora*, *D. rostrata*, *D. virgata*, *D. violacea*, *Ephedra tweendiana*, *Parkia platycephala* e *Vatairea macrocarpa* foram purificadas no Biomol-LAB - UFC.

As lectinas de algas marinhas, *Bryothamnion triquetrum* e *B. seafhortti*, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Sampaio do Departamento de Engenharia de Pesca – UFC e a lectina de *Abrus pulchelus* pelo Dr. Márcio Viana Ramos do Departamento de Biologia – UFC.

As lectinas de monocotiledôneas, *Galanthus nivalis* (GNA), *Listera ovata* (LOA) e *Arum maculatum* (AMA) foram cedidas pelos Drs. W. J. Peumans e E. Van Damme do laboratório de Fitopatologia e Proteção Vegetal - KUL, Bélgica.

2.2 – PLASMÍDIOS, CEPAS BACTERIANAS E ENZIMAS

As cepas de *Escherichia coli*: XL1-Blue como hospedeira de expressão e DH5 α como hospedeira de clonagem (CLONTECH Laboratories, Inc.). O pMOSBlue como vetor para clonagem da aminopeptidase foi fornecido pela Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA). A enzima DNA ligase T4 foi obtida da Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA), Eco RI, Xba I e Taq DNA polimerase da Boehringer Mannheim (Alemanha).

2.3 - OUTROS MATERIAIS

Os reagentes e acessórios utilizados para eletroforese bidimensional foram fornecidos pela Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA). Ez-Link™ NHS-LC-Biotin, Step™ NBT/BCIP, Reacti-Gel™ 6X e Streptavidin-alkaline phosphatase foram obtidas por Pierce Chemical Company (Il., USA). Outras reagentes como tampões, sais, aminoácidos, marcadores de massa molecular e inibidores de enzima foram comprados à Sigma Aldrich (MO, USA).

3 - MÉTODOS

3.1 - PREPARAÇÃO DE LECTINAS

Para este procedimento experimental, a metodologia descrita por Moreira e Cavada (1984) foi utilizada no isolamento de lectinas presentes em sementes quiescentes de *Canavalia brasiliensis* Mart., *C. bonariensis*, *C. aff. sp. boliviana*, *C. grandiflora*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea grandiflora*, *D. guianensis*, *D. rostrata*, *D. violacea* e *D. virgata*.

A farinha de sementes de cada espécie foi submetida a extração com solução de NaCl 0,15 M (1:10, m/v) por 12 horas a temperatura ambiente com agitação constante. A mistura foi então centrifugada a 16.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O resíduo obtido foi descartado e o sobrenadante (extrato total) aplicado a uma coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM. A coluna foi lavada exaustivamente até que todo o material não-retido fosse eluído por completo. Em seguida, a lectina retida foi eluída em solução de glicose 0,1 M, dializada por 1 hora em ácido acético 0,01M e exaustivamente contra água destilada, liofilizada e estocada em recipientes hermeticamente fechados, a temperatura ambiente.

As etapas de purificação foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptoetanol (PAGE-SDS), realizadas segundo o método de Laemmli (1970) adaptado para o uso de placas (14,5 x 12,3 cm). Foram monitoradas através de atividade hemaglutinante determinada segundo o método descrito por Moreira e Perrone (1977) modificado para o uso de hemácias de coelho a 2 % em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M (TS).

3.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE LECTINAS

3.2.1 - Manutenção e Produção de *Acyrtosiphon pisum*

O pulgão da ervilha, *A.pisum*, foi introduzido no Laboratório de Biologia Aplicada do INRA-INSA de Lyon através de uma amostra coletada em uma plantação de Alfafa (*Medicago sativa* L.) no ano de 1986 (RAHBÉ *et al.*, 1988). Este clone, denominado Ap-LL01, possui as características nutricionais do biótipo denominado Lusignan (SRIVASTAVA *et al.*, 1985; FEBVAY *et al.*, 1988). Em laboratório, os insetos foram mantidos em plantas jovens de *Vicia faba* cv. aquadulce em câmaras de crescimento a uma temperatura de 21 °C, umidade relativa de 60 % e regime de luz com 16 horas de claro e 8 horas de escuro.

3.2.2 - Manutenção e Produção de *Sitophilus oryzae*

Adultos de *Sitophilus oryzae* foram mantidos em sementes de ervilhas em câmaras de crescimento a uma temperatura de 27 °C \pm 2 °C, umidade relativa de 70 % e regime de luz de 16 horas de claro e 8 horas de escuro.

3.2.3 - Composição e Preparação da Dieta Artificial para *Acyrtosiphon pisum*

O meio artificial (Ap3), utilizado para os experimentos, foi preparado segundo método descrito por Febvay e colaboradores (1988) modificado para a

concentração de sacarose reduzida em 20 %, fenilalanina acrescentada em 21 % e β Ala - Tyr que foi retirada da dieta (TABELA 3). As soluções contendo as proteínas a serem testadas, foram preparadas por diluição de uma solução mãe 1 mg.mL^{-1} , em seguida depositadas entre 2 folhas de Parafilm (American Can Company, USA), sob condições estéreis, e dispostas em caixas cilíndricas ($\varnothing_{\text{interno}} : 1,7 \text{ cm}$; $\varnothing_{\text{total}} : 2,0 \text{ cm}$; $h : 1,6 \text{ cm}$) (FIGURA 2a).

3.2.4 – Teste de Toxicidade “in vitro” com *Acyrtosiphon pisum*

Os ensaios foram realizados durante um período de 7 dias utilizando metodologia descrita por Rahbé e Febvay (1993). Larvas com 0(zero) dia de vida foram depositadas em meios artificiais contendo as lectinas a diferentes concentrações (5 à $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A porcentagem de larvas fixadas foi determinada após 1 hora, servindo como medida de aceitação ao meio. As larvas não - fixas foram trocadas. A mortalidade foi observada diariamente até que as larvas atingissem a idade adulta. No sétimo dia, os pulgões sobreviventes foram pesados individualmente em microbalança Mettler AE 163. A toxicidade de cada lectina foi assim expressa em LC_{50} (concentração em proteína necessária para matar 50% da população inicial no sétimo dia de desenvolvimento, com relação aos indivíduos do controle) e em IC_{50} e IC_{20} (concentração em proteína capaz de induzir uma inibição de crescimento de 50 % e 20 % no sétimo dia de desenvolvimento, com relação aos indivíduos do controle).

3.2.5 – Teste de Toxicidade “in vitro” com *Sitophilus oryzae*

Para os ensaios de toxidade foram preparadas sementes artificiais à base de farinha de trigo segundo metodologia adotada no laboratório de Lyon. Em

Eppendorfs pesou-se 250 mg de farinha de trigo intacta, a Con Br (concentração final 0,01 a 1%) e adicionou-se a esta mistura 0,160 mL de H₂O destilada. Com uma espátula mesclou-se a massa formada com o propósito de obter uma mistura homogênea. Em seguida, modelou-se as sementes (\varnothing_{total} : 5 mm e h: 3 cm) e as deixou secar durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em um depósito de acrílico cilíndrico (\varnothing_{total} : 10 cm e h: 7 cm) com fundo em arame perfurado e tampa plástica, depositou-se 30 insetos adultos e as sementes artificiais (FIGURA 2b). A mortalidade foi então observada diariamente durante 14 dias, mantendo-se o bioensaio sob condições constantes de temperatura e umidade relativa.

3.2.6 – Análise dos Dados de Toxicidade

a - Taxa de Sobrevivência

A determinação dos valores LC₅₀ foi realizada a partir do programa Toxicologie™ (para MacIntosh®) criado por Febvay e Rahbé (1991). A teoria deste cálculo consiste em linearizar pela utilização de “probits”, a sigmóide correspondente a porcentagem de mortalidade em relação ao logaritmo da concentração de lectinas.

b - Inibição do Crescimento

O peso médio dos afídeos de cada repetição foram comparados através da análise de variância a um fator (ANOVA – StatView 4©, Abacus, Inc., USA). Um teste de comparação a *posteriori* (teste de Bonferroni/Dunn - SuperANOVA©, Abacus, Inc., USA) permitiu eventualmente suprimir uma repetição da análise. Em seguida, os pesos médios de cada tratamento foram comparados

TABELA 3. Composição da dieta artificial para *Acyrtosiphon pisum*

Componente	Quantidade (mg/100 mL)
Sacarose	20000,00
L- alanina	178,71
Beta-alanina	6,22
L- arginina	244,9
L- asparagina H ₂ O	298,55
L- ácido aspártico	88,25
L- cisteína	29,59
L- ácido glutâmico	149,36
L- glutamina	445,61
Glicina	166,56
L- histidina HCl H ₂ O	136,02
L- isoleucina	164,75
L- leucina	231,56
L- lisina HCl	351,09
L- metionina	72,35
Ornitina HCl	9,41
L- fenilalanina	294,53
L- prolina	129,33
Serina	124,28
L- treonina	127,16
L- triptofano	42,75
L- tirosina	38,63
L- valina	190,85
Citrato de cálcio	10,00
Benzoato de colesterol	2,50
MgSO ₄ 7.H ₂ O	242,00
Ácido p-aminobenzóico	10,00
Ácido L-ascórbico	100,00
Biotina	0,10
D-pantotenato de cálcio	5,00
Cloreto de colina	50,00
Ácido fólico	1,00
i-Inositol anidro	42,00
Amido nicotínico	10,00
Piridoxina HCl	2,50
Riboflavina	0,50
Tiamina HCl	2,50
CuSO ₄ 5.H ₂ O	0,47
FeCl ₃ 6.H ₂ O	4,45
MnCl ₂ 4.H ₂ O	0,65
NaCl	2,54
ZnCl ₂	0,83
KH ₂ PO ₄	250,00

*pH ajustado para 7,5

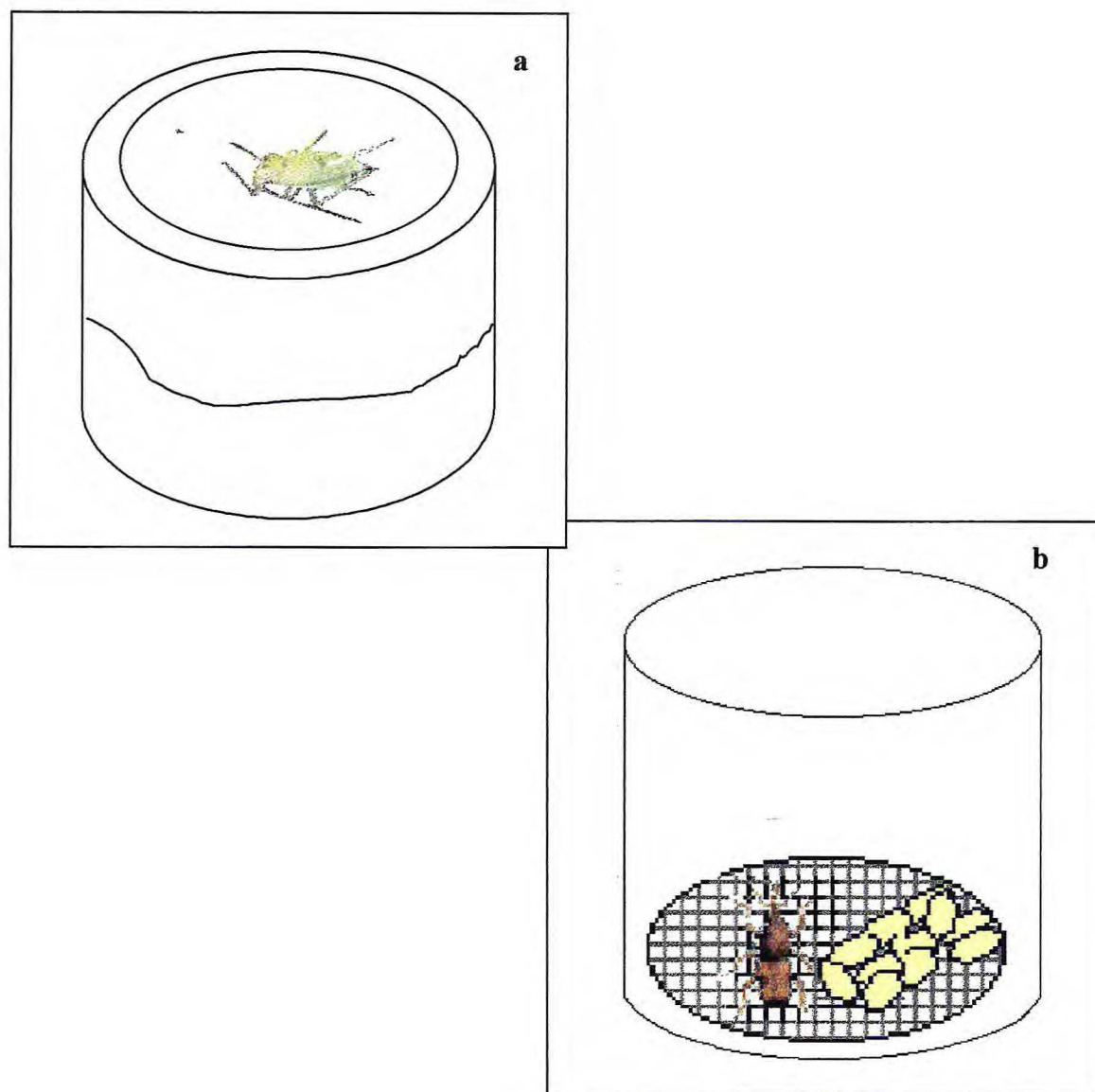


FIGURA 2. Câmaras de bioensaio para a avaliação dos efeitos de lectinas sobre o desenvolvimento de *Acyrtosiphon pisum* (a) e *Sitophilus oryzae* (b).

(ANOVA - teste de Bonferroni/Dunn) para evidenciar os efeitos das diferentes concentrações de lectinas.

Para comparar os efeitos das lectinas testadas em experimentos independentes, os valores IC_{20} e IC_{50} foram determinados através de regressão não-linear, ajustando os dados ao modelo de Michaelis-Menten utilizando o programa AjustNonLin para MacIntosh® (BONNOT & FEBVAY, 1992). A equação segundo o modelo Michaelis-Menten é a seguinte:

$$y = C + \frac{P_1 \cdot x}{P_2 + x}$$

Onde ,

x = concentração de lectina

y = peso médio dos afídeos

C = peso médio dos afídeos mantidos em dieta artificial sem lectinas

P_1 = inibição teórica máxima

quando $x \rightarrow \infty$, $y = C + P_1$)

P_2 = concentração de lectina pela qual $IC=50$ % de inibição teórica máxima

(quando $x = P_2$, $y = C + P_1/2$)

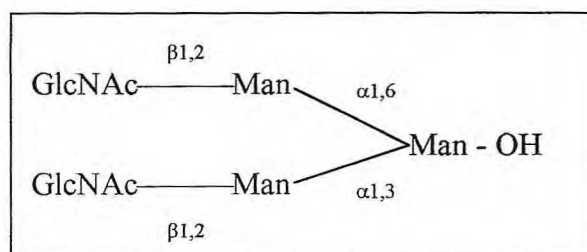
As concentrações capazes de inibir em 20 e 50 % o crescimento (IC_{20} e IC_{50}) foram deduzidas deste modelo, e calculadas pelas fórmulas abaixo:

$$IC_{20} = - \frac{P_2 \cdot C}{5 \cdot P_1 + C}$$

$$IC_{50} = - \frac{P_2 \cdot C}{2 \cdot P_1 + C}$$

3.2.7 – Ensaio de Inibição por Açúcar

Com o objetivo de relacionar os efeitos tóxicos de lectinas a sua capacidade de se ligar a carboidratos, foi adicionada a dieta artificial lectina e o açúcar inibidor, manotriose bis N-acetilglucosamil (GlcNAc β 1,2 Man, ver abaixo). Ninfas recém-nascidas foram transferidas de plantas de *Vicia faba* a saches com dieta artificial (n. = 3 x 18) contendo Con A e Con Br na concentração correspondente a IC₅₀ (160 e 110 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e o açúcar (20 μM).



3.2.8 - Ensaio de Toxicidade com Lectina Desmetalizada

Para a desmetalização de Con Br seguiu-se o método descrito por Galbraith e Goldstein (1970). A lectina (5,0 mg) foi dissolvida em 5,0 mL de H₂O deionizada contra EDTA 0,25M por 48 horas, e em seguida contra H₂O deionizada por 48 horas. Após diálise e liofilização foi feito ensaio de atividade tóxica seguindo-se o método descrito anteriormente, utilizando a concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para lectina.

3.3 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES DA CON BR NO TRATO DIGESTIVO DE *Acyrtosiphon pisum*

3.3.1 - Dissecção de Tratos Digestivos

Tratos digestivos de afídeos adultos paternogênicos foram dissecados sob lupa. Os insetos foram fixados ventralmente sob lâmina através de adesivo dupla-face e imersos em solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,6. O trato digestivo (TD) foi extraído pelo corte da região caudal liberando o reto e o intestino, em seguida arrancando-se a cabeça e retirando-se parte do TD, separando a cabeça através de um corte entre o esôfago e o estômago. Os TD, inteiros ou em partes (estômago, intestino e reto), foram estocados em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,6 contendo E64 10 μ M e PMSF 10 mM sob o gelo até o último tubo digestivo ser dissecado após o que foram utilizados imediatamente ou conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por tempo indeterminado.

3.3.2 - Marcação de Lectinas com Biotina

As lectinas utilizadas em ensaios de Lectin Blot foram marcadas com Biotina (Ez-LinkTM NHS-LC-Biotin, Pierce) através de metodologia descrita por Hnatowich e colaboradores (1987) modificada para a utilização de tampão bicarbonato de sódio pH 7,4 contendo NaCl 0,2 M.

As lectinas foram dissolvidas em tampão bicarbonato de sódio pH 7,4 contendo NaCl 0,2 M. Em seguida foi adicionado 75 μ l de uma solução de NHS-LC-Biotina, dissolvida previamente em dimetilformamida (1:1), e manteve-se a mistura por 2 horas à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A biotina livre foi removida através de centrifugações a 10000 rpm, $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 50 minutos utilizando microcentrator[®] (Millipore Corporation, MA, USA.) com filtro de 3 kDa.

3.3.3 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante de Extratos de Tratos Digestivos de *Acyrtosiphon pisum*

As eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptoetanol realizadas com amostras de *A.pisum*, seguiram o método de Laemmli (1970) adaptado ao uso do sistema Mini-Protean da Biorad.

Na montagem das placas foram usados gel de aplicação contendo 4,5 % de poliacrilamida e 0,4 % de SDS em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e um gel de separação contendo 10 % de poliacrilamida e 0,4 % de SDS em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 com SDS 10 %, glicerol 2 % e azul de bromofenol a 0,025 % tratadas a 100 °C por 5 minutos em banho-maria.

A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante (200 V) a temperatura ambiente. O gel, quando não utilizado para *Lectin Blot*, foi corado com coomassie brilliant blue R-250 a 0,05 % preparado em uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5), sendo então descorado em uma solução de metanol, ácido acético e água (1:2:8,5).

Como marcadores de massa molecular foram utilizadas fosforilase b (94 kDa) albumina sérica bovina (67 kDa) ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,2 kDa).

3.3.4 - Lectin Blot

O Lectin Blot foi realizado segundo método descrito por Cicchetti e colaboradores (1992) modificado para o uso de lectinas marcadas com biotina (FIGURA 3). Os extratos totais de proteínas de membrana de tecidos de tratos digestivos foram homogeneizados em tampão (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 com SDS 10

%, glicerol 20 %, DTT 1,5 % e azul de bromofenol 10 %) com o auxílio de "potter" para tubos de Eppendorf e tratadas em seguida a 100 °C por 5 minutos.

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, como descrito no item 3.4.3, e transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µM Protan® BA (Schleicher & Schuell GmbH, Alemanha) utilizando sistema vertical da Biorad. A transferência foi realizada com voltagem constante de 40 V durante 4 horas em presença de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,3 contendo metanol 20 %.

Após transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 200 mM, 0,05 % de Triton X-100 (TTCS) e 5 % de leite desnatado durante 14 horas a 37 °C sob agitação. Após ser lavada com TTCS, a membrana foi colocada em contato com a lectina - biotina conjugada dissolvida (1:100) em tampão de blocagem (TTCS e 5 % de leite desnatado) durante 1 hora a 37 °C sob agitação. Novamente lavada com TTCS, adicionou-se o tampão de blocagem contendo avidina - alcalina fosfatase conjugada (2 µg.mL⁻¹). Após 1 hora a 37 °C sob agitação, a revelação foi realizada com NBT/BCIP (nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate-p-toluidine salt, Pierce Chemical Company, Il., USA).

3.3.5 - Imobilização de Con Br em Agarose

A lectina de Con Br foi imobilizada em uma matriz comercial contendo 6 % de agarose (Reacti-Gel™6X) segundo protocolo que acompanha o produto com algumas modificações descritas abaixo. Aproximadamente 1,0 mL do gel foi lavado inicialmente em H₂O para total retirada da acetona. Em seguida, foi equilibrado em tampão NaHCO₃ 0,1 M pH 8,4/NaCl 50 mM contendo CaCl₂ e MnCl₂ 100 µM e 5 % de α-metil-D-manosídeo. A proteína pura (Con Br), diluída em solução tampão, foi misturada ao gel e mantida em contato durante 24 horas. Retirada a solução lectínica, foi adicionado ao gel glicina 1 M, permanecendo nesta solução durante 2 horas. Posteriormente, a coluna foi equilibrada com tampão PBS contendo azida 0,05 % sendo conservada a 4 °C.

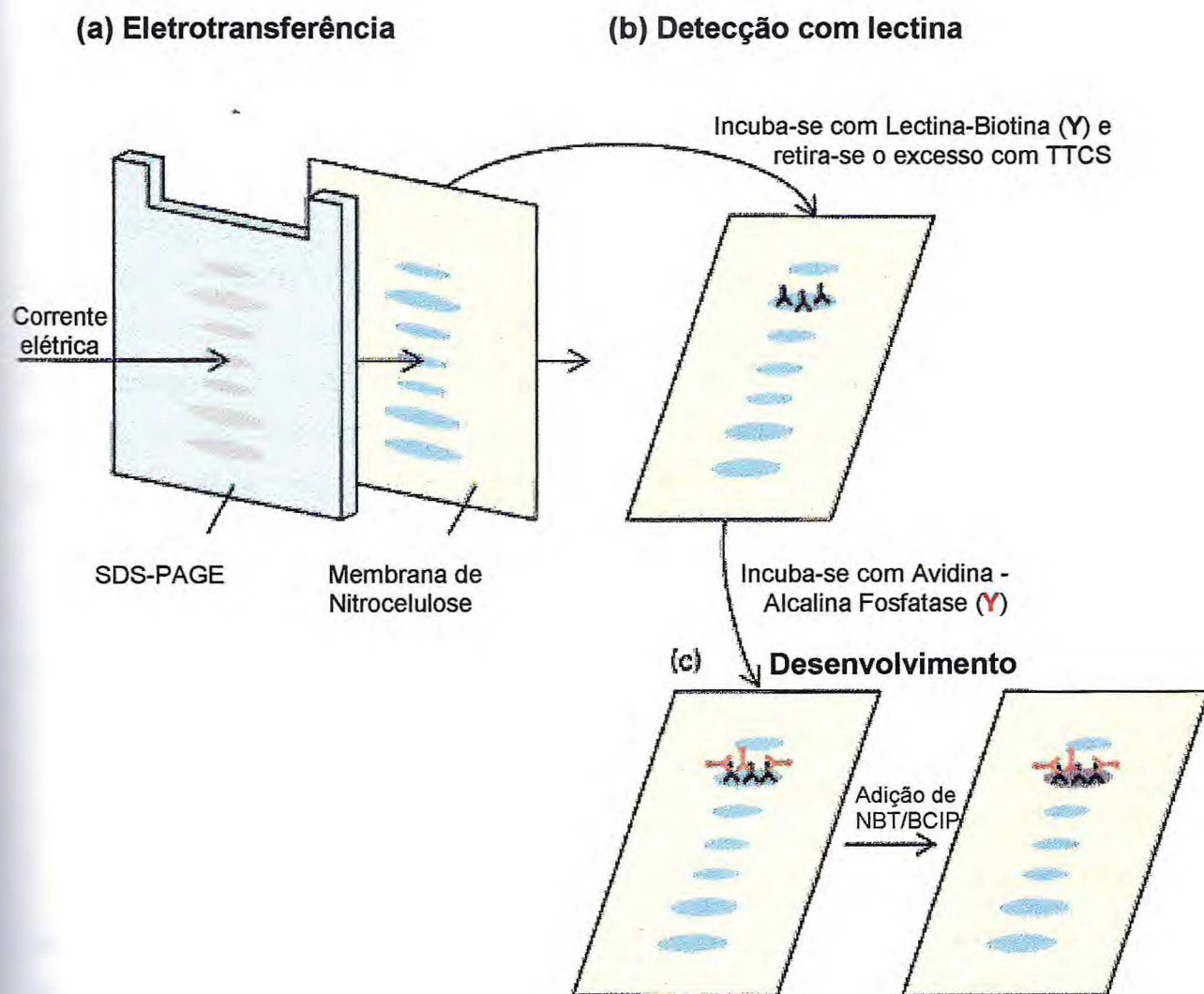


FIGURA 3. Lectin Blot, procedimento para detecção de glicoconjugados do trato digestivo de *Acyrtosiphon pisum*.

3.3.6 - Extração de Proteínas de Tratos Digestivos de *Acyrtosiphon pisum*

Para cada cromatografia de afinidade realizada usamos 1000 tratos digestivos (TD) dissecadas como descrito previamente no item 3.3.1. Os TD conservados a - 20 °C, após serem descongeladas foram lavados 2x em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 contendo E64 10 µM e PMSF 0,1 mM (TTI). O precipitado obtido após a centrifugação a 1000 x g durante 1 minuto a 4 °C, foi ressuspenso em TTI contendo CHAPS 1 %, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM e NaCl 1 M, em seguida, macerado em "potter" de vidro (80 strokes) seguido de sonicação, 3 ciclos de 10 s com intervalos de 45 s. A amostra após 3 horas em contato a 4 °C e sob agitação, foi centrifugada a 20000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi reequilibrado em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo E64 10 µM e PMSF 0,1 M (TTI2) e conservado a - 20 °C até eventual utilização.

3.3.7 - Cromatografia de Afinidade em coluna de Con Br-Agarose de Extratos de Tratos Digestivos de *Acyrtosiphon pisum*

A amostra preparada segundo o item 3.4.6 foi reequilibrada em solução tampão de Tris 20 mM pH 7,3, EDTA 10 mM, EGTA 1 mM (TEE) na presença dos inibidores de proteases E64 10 µM e PMSF 0,1 mM. O material solúvel foi aplicado em coluna de Con Br-Agarose previamente equilibrada com tampão TEE, contendo CaCl₂ e MnCl₂ 1 mM e mantido em contato durante 12 horas. A coluna foi lavada com tampão de lavagem até que todo o material não retido fosse eluído. Em seguida, o material retido foi eluído em solução TEE contendo 0,1 M e 0,5 M de α-metil-manosídeo. Os picos foram dializados exaustivamente contra H₂O destilada, liofilizados e estocados a 4 °C em recipientes fechados.

3.3.8 - Eletroforese Bidimensional do pIII da Cromatografia de Afinidade em Con Br - Agarose

As eletroforeses bidimensionais (PAGE-2D) foram realizadas segundo protocolo fornecido pela Amersham Pharmacia utilizando o sistema Multiphor™ II, incluindo os acessórios para focalização isoeétrica e o sistema Mini-Protean Biorad para segunda dimensão, modificado para o uso do tampão de amostra. Os picos da cromatografia de afinidade, após o devido tratamento, foram aplicados em Immobiline DryStrip Gel pH 3-10NL (7 cm) e submetidos a focalização isoeétrica. A segunda dimensão foi realizada em géis de PAGE-SDS a 10 % (ver ítem 3.3.3). Os géis, após a migração, foram submetidos a coloração com Amido black 0,3 % com o fim de sequenciamento, ou a coloração a prata (BLUM *et al.*, 1987) para visualização.

O tampão de amostra da primeira dimensão segue sugestão de Rabilloud (1998) para melhorar a solubilização de proteínas de membranas, compõe-se de:

Componente	[]	Quantidade
Tampão IPG 3-10	0,4 %	8,00 µL
DTT	10 µM	3,08 mg
Triton x-100	0,4 %	8,00 µL
Tio-uréia	2 M	304,40 mg
Uréia	7 M	840,00 mg
Chaps	4 %	80,00 mg
H ₂ O q.s.p		2,00 mL

As amostras diluídas neste tampão (125 µL) foram aplicadas em Immobiline DryStrip Gel e mantidas em contato durante 12 horas após o que foram submetidas a focalização isoeétrica sob as condições para a fonte geradora (Pharmacia, EPS 3501 XL power supply) abaixo:

Fase	Linear/Gradiente	V	mA	W	Tempo (min)
1	G	100	1	5	1
2	G	300	1	5	60
3	G	3500	1	5	90
4	L	3500	1	5	90

3.3.9 - Microsequenciamento de Proteínas

O sequenciamento de proteínas foi realizado pelo Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas - Institut Pasteur (Paris, França). Após serem separadas através de eletroforese bidimensional os "spots" referentes a cada glicoproteína de interesse foram digeridas durante 18 horas em 100 μ L de Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,6 contendo 0,01 % de Tween 20, a 30 °C em presença de tripsina (0,2 μ g) ou com SDS 0,03 % a 35 °C em presença de endolysina-C (0,4 μ g), dependendo do "spot". Os peptídeos resultantes foram injetados em uma coluna de DEAE HPLC ligada a C18 RP-HPLC (DEAE - 30 mm e C18 - 150 mm de comprimento e diâmetro interno -1 mm da Interchim) eluídas com 2 - 70 % de acetonitrila, TFA 0,1 %. O perfil cromatográfico resultante, indicou os "spots" a serem selecionados para seqüência em um microsequenciador automático Edman (Applied Biosystems 473 A ou 494 protein sequencer).

3.4 - CLONAGEM DE UMA AMINOPEPTIDASE LOCALIZADA NO TRATO DIGESTIVO DO *Acyrtosiphon pisum*

3.4.1 - Extração do ARN_{total} e purificação do ARN_{mensageiro} de *Acyrtosiphon pisum*

O ARN_{total} foi purificado a partir do homogenato de tratos digestivos de *A.pisum* utilizando o reagente Trizol (Sigma Aldrich, St. Louis). Para tanto, mil tratos digestivos foram dissecados sob condições estéreis, macerados em "potter" de vidro com 1,0 mL de Trizol e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos. Após o que foi adicionado 0,2 mL de Clorofórmio, agitado por 15 segundos e mantido a temperatura ambiente durante 3 minutos. Logo em seguida, foi centrifugado a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. A fase aquosa incolor foi transferida para um tubo de Eppendorf na qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol. Após 10 minutos em

temperatura ambiente, centrifugou-se a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, centrifugado durante 5 minutos a 7500 rpm e 4 °C, então redissolvido em H₂O DEPC. A concentração e qualidade do ARN_{total} extraído foi verificada através da medição da absorbância em espectrofotômetro (A_{260}/A_{280}) e eletroforese não desnaturante, respectivamente (Sambrook *et al.*, 1989). O ARN_{mensageiro} foi purificado a partir do ARN_{total} utilizando Dynabeads® Oligo (dT)25 (DynaL A.S, Oslo, Noruega) com protocolo fornecido pelo fabricante.

3.4.2 - Construção da Biblioteca Genômica do *Acyrtosiphon pisum*.

Uma biblioteca genômica (cDNA) específica para tratos digestivos de *A.pisum* foi construída com SMART™ cDNA (CLONTECH Laboratories, Inc.) seguindo protocolo fornecido pelo fabricante (FIGURA 4).

3.4.3 - Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos degenerados foram desenhados a partir de seqüências nucleotídicas de aminopeptidases disponíveis (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>) para amplificar uma região do cDNA correspondente ao gene de interesse. Os oligonucleotídeos sintetizados pela EUROGENTEC (França) foram os seguintes: APN-U538 - fita senso (TTY CCI TGY T5Y GAY GAR CC) e APN-L1099 - fita anti-senso (GCR AAI CCY TCR TTI AKC CA).

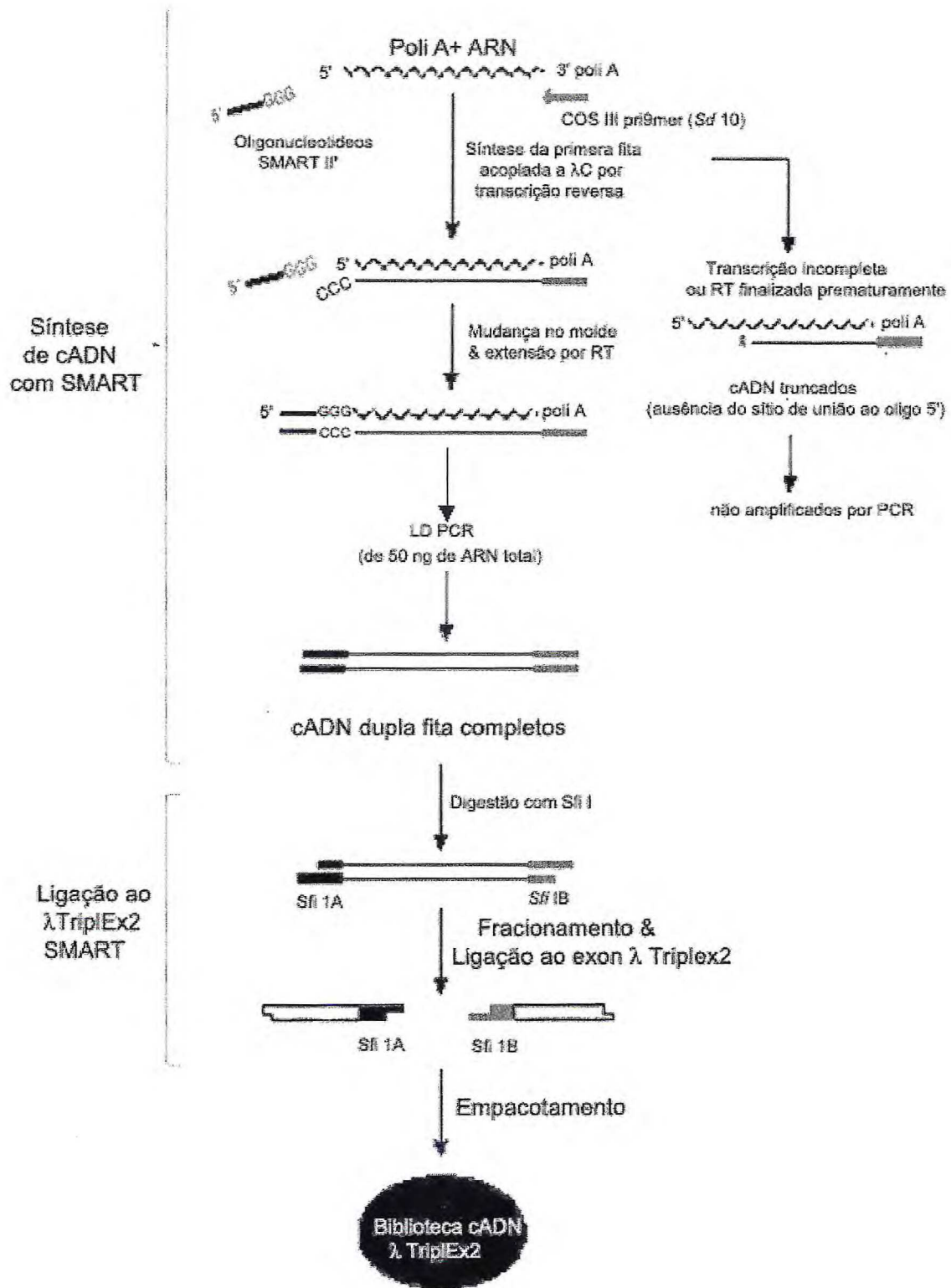


FIGURA 4. Construção da biblioteca genômica do *Acyrtosiphon pisum*.

3.4.4 - Amplificação do Gene Parcial da Aminopeptidase por Reação em Cadeia da DNA polimerase (PCR)

O fragmento de DNA correspondente a sequência parcial do gene da aminopeptidase foi amplificado por PCR, utilizando-se como substrato a biblioteca genômica do *A. pisum* na forma de fago (ver ítem 3.4.2) e os oligonucleotídeos citados no ítem anterior. A seguir uma descrição simplificada das condições para PCR.

Em um tubo de Eppendorf estéril foram adicionadas os componentes abaixo. Os oligonucleotídeos liofilizados foram diluídos inicialmente em H₂O estéril numa solução mãe na concentração de 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, para PCR as soluções utilizadas tinham concentração inicial de 10 $\text{pM}.\mu\text{L}^{-1}$.

Componente	Volume de Reação (μL)
Tampão – PCR 10x (MgCl_2 1,5 mM)	5,00
dNTP 2,5 mM	4,00
Oligo 1 (APN-U538)	1,50
Oligo 2 (APN-L1099)	1,50
Taq DNA polimerase (0,5 U/ μL)	0,25
H ₂ O estéril	32,75
DNA matrix	5,00

Após a adição do último componente, a Taq DNA polimerase, os tubos de Eppendorf foram transferidos para um termociclador (Perkin-Elmer Ltd, Bucks., UK.) seguindo o seguinte esquema de 38 ciclos:

n.º de Ciclos	Temperatura x Tempo
1x	94 °C durante 5 min
35x	94 °C durante 30 s
	54 °C durante 45 s
	72 °C durante 45 s
1x	72 °C durante 7 s
1x	10 °C por tempo indeterminado

Após o último ciclo as amostras foram mantidas a 4 °C até a sua eventual utilização. A análise dos produtos da PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1 % (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizando um transiluminador UV para verificação e aparelhagem de fotografia para película Polaroid®

3.4 5 - Purificação do cDNA Amplificado da Aminopeptidase e Clonagem no Vetor *pMosBlue*

A banda correspondente ao gene da aminopeptidase amplificado foi cortado do gel de agarose (item 3.4.3.2) e purificado utilizando QIAquick Gel Extraction (Qiagen Inc., USA) com protocolo fornecido pelo fabricante.

A clonagem foi realizada utilizando *pMosBlue* blunt ended cloning kit (Amersham Pharmacia Biotech, NJ - USA) modificado para a utilização de células competentes DH5 α . Utilizamos para ligação 25,2 ng do inserto para 50,0 ng do vetor *pMosBlue* com tempo de incubação de 20 horas a 11 °C.

Na transformação, realizada através de eletroporação, usamos células competentes DH5 α preparadas segundo protocolo fornecido por Sambrook e colaboradores (1989). Para 50 μ L de DH5 α foram adicionados 1 e 4 μ L do produto de ligação, transferidos a uma cubeta de eletroporação e submetidos à 2,5 V com tempo constante. Em seguida, adicionamos 950 μ L de meio SOC, incubamos a 37 °C por 1 hora e centrifugamos a 4000 rpm por 1 minuto à 4 °C. Uma alíquota do

sobrenadante (150 μ L) foi plaqueada em LB Agar/Ampicilina contendo X-Gal e IPTG. Após 12 horas a 37 °C, os clones positivos foram selecionados e submetidos a lise Alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) e em seguida a digestão com as enzimas Eco RI e Xba I a 37 °C por 2 horas. Após a digestão, os produtos foram submetidos a eletroforese e selecionados para seqüência.

Componente	Volume (μ L)
Plasmídeo	3,0
Tampão H ^a	1,0
Eco RI	0,5
Xba I	0,5
H ₂ O	5,0

^a Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, MgCl₂ 0.1 M,
NaCl 1 M, DTT 10 mM

3.4.6 - Sequência do Gene Parcial da Aminopeptidase de *Acyrtosiphon pisum*

A determinação da seqüência de nucleotídeos do inserto foi realizada pelo método de enzimático de cadeia nucleotídica por didesoxi, descrito por Sanger e colaboradores (1977), em sequenciador automático pela companhia Genome Express (França).

4 - RESULTADOS

4.1 - EFEITOS DE LECTINAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO NINFAL DE *Acyrtosiphon pisum*

4.1.1 - Mortalidade

Ao analisarmos os efeitos biológicos de nove lectinas da tribo Diocleinae (TABELA A20) sobre a sobrevivência de ninfas de *A.pisum*, observamos que nas doses de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ as lectinas do gênero *Canavalia* (Cabo, Cbol e Con Br) apresentaram uma mortalidade em torno de 60 % no sétimo dia de desenvolvimento das mesmas. Efeito contrário foi observado para Cgra cuja presença na dieta não alterou a taxa de sobrevivência das ninfas (FIGURA 5). A lectina de *Dioclea virgata* (Dvir) apresentou-se como a mais letal das Diocleinae na dose de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduzindo a 3,7 % a população inicial no sétimo dia de bioensaio, seguida pela Dros e DVL com 27,8 e 40,74 % respectivamente. As lectinas DGL e Dgui foram as menos letais do gênero *Dioclea*. Comportamento semelhante foi observado para CFL, única representante do gênero *Cratylia* (FIGURA 6). Os valores de LC_{50} indicaram a Dros, entre todas lectinas de Diocleinae, como a mais letal pois necessita de apenas 67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para reduzir em 50 % a população inicial de ninfas, enquanto a DGL foi considerada pouco tóxica, quando analisada sob este parâmetro (TABELA 4).

Seis lectinas de características moleculares distintas às lectinas de Diocleinae foram analisadas (TABELA A20). A lectina de *Abrus pulchellus* (APL) apresentou-se como uma potente molécula inseticida que ao ser administrada oralmente às ninfas do pulgão provoca 100 % de mortalidade ainda no quarto dia de desenvolvimento ninfal. Enquanto que as lectinas de *Bryothamnion seafhortti* (Bs), *B.triquetrum* (Bt), *Ephedra tweendiana* (EPH) e *Parkia platycephala* (PPL) não são letais a dose de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) apresenta uma redução de 30 % na taxa de sobrevivência no quarto dia de desenvolvimento,

permanecendo inalterada até o final do bioensaio (FIGURA 7). Os valores de LC_{50} calculados indicaram que Bs, Bt, EPH, VML e PPL não são letais ao *A.pisum* a concentrações máximas de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto a APL apresentou a menor LC_{50} ($20,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de todas as lectinas testadas (TABELA 4).

4.1.2 – Inibição do Crescimento

Os efeitos das diferentes concentrações (10 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de Con Br, CFL e DVL sobre o crescimento do pulgão da ervilha, podem ser visualizados na FIGURA 8. As três lectinas são capazes de inibir de forma significativa o crescimento ninfal, a partir das doses de 63, 50 e $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Con Br, CFL e DVL, respectivamente (TABELAS A1, A2, A3). A administração de doses mínimas destas lectinas (2 a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), denominadas subletais, não tiveram um efeito pro-biótico e tão pouco reduziram de forma significativa o peso médio do pulgão (FIGURA 9; TABELAS A4, A5 e A6). As lectinas de Diocleinae Cabo, Cbol, Cgra, Dgui, DGL, Dros, Dvir foram analisadas nas concentrações de 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURAS 11 e 12). Somente a DGL apresentou uma baixa toxicidade provocando uma redução máxima de 15 %, considerada não-significativa. Por outro lado, Dvir e Cabo obtiveram os maiores percentuais de mortalidade, 80 e 85 % respectivamente. Sobre as IC_{20} e IC_{50} , destacaram-se as lectinas de Con Br, Cbol, Cabo, Dros e Dvir que são capazes de inibir o crescimento do inseto em 50 % com doses em torno de 100 a $122 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disto, a DGL foi incapaz de inibir o crescimento do inseto nas doses testadas (TABELA 4).

Na FIGURA 12 pode-se observar os efeitos de Bs, Bt, EPH, PPL e VML as quais não foram capazes de inibir de forma significativa o crescimento das ninfas do pulgão (TABELAS A15, A16, A17, A18 e A19). Entretanto, a APL na dose de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ reduz em 86,3 % o peso médio dos adultos. O cálculo das IC_{20} e IC_{50} determinaram: Bs, EPH, PPL e VML incapazes de inibir o crescimento do pulgão. Enquanto Bt apresentou uma IC_{20} de $869 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e APL uma IC_{50} de $1,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de acordo com o modelo estatístico utilizado (TABELA 4).

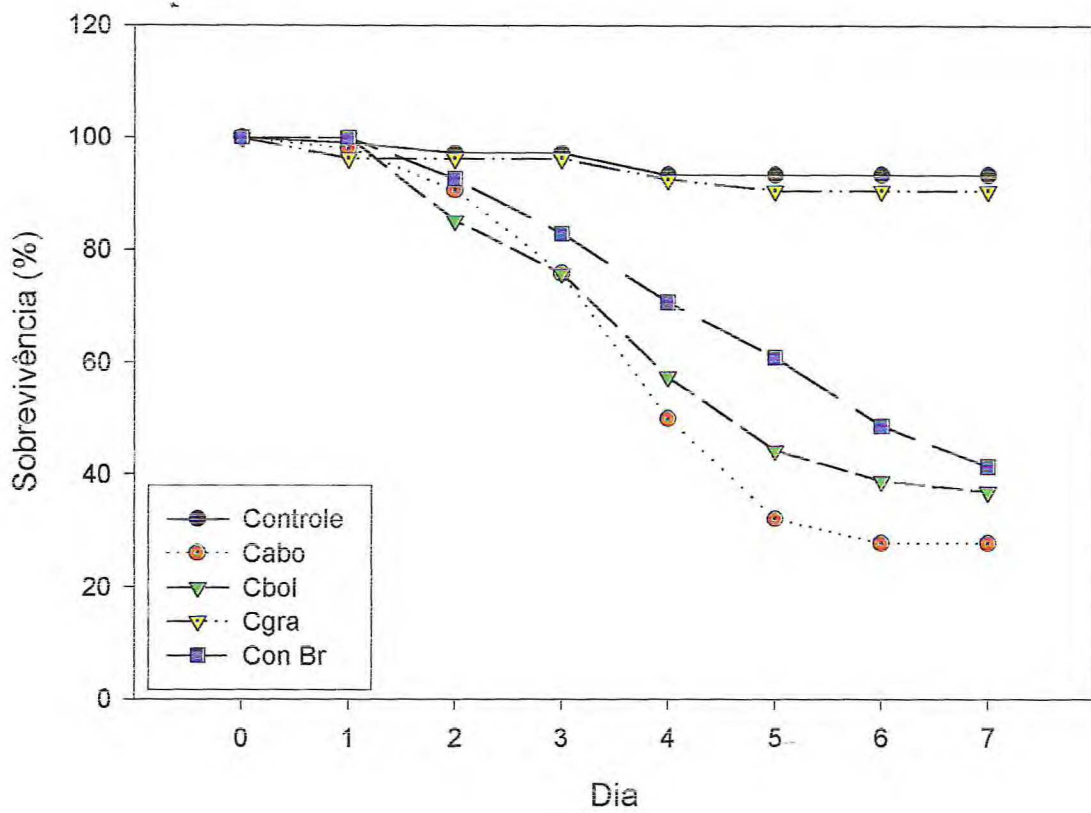


FIGURA 5. Sobrevivência das ninfas de *Acyrthosiphon pisum* em dieta artificial contendo $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Cabo, Cbol, Con Br e Cgra.

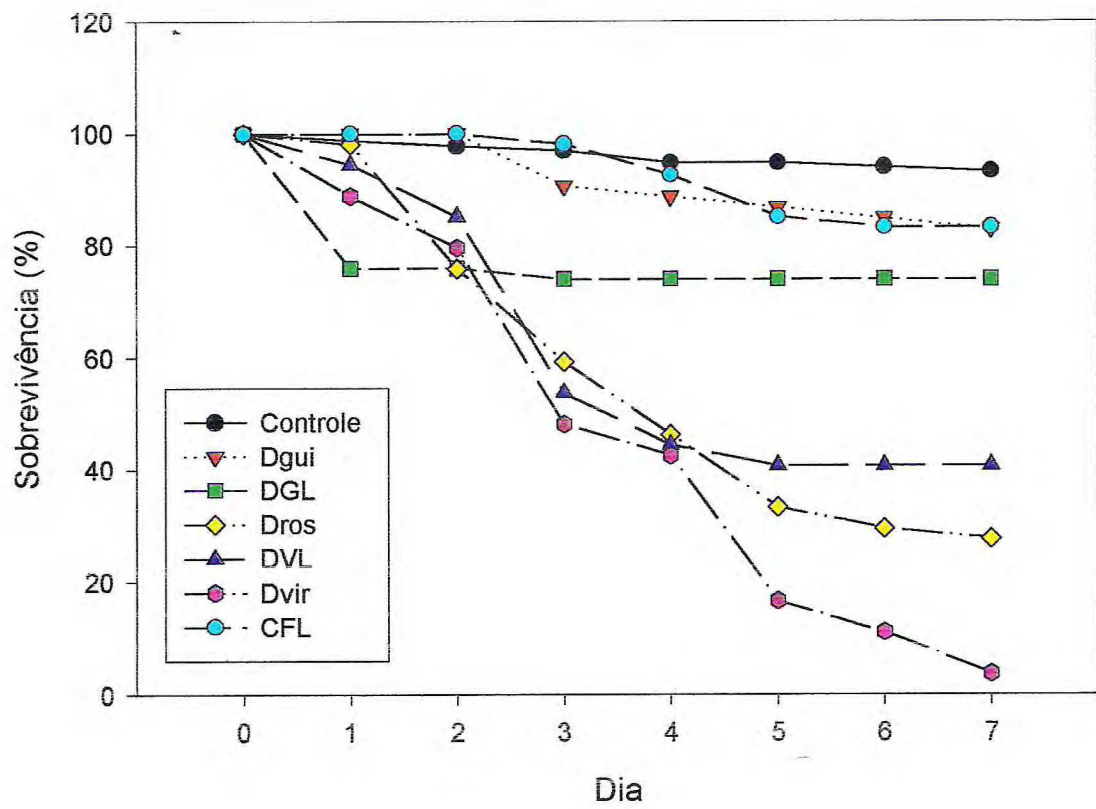


FIGURA 6. Sobrevivência das ninfas de *Acyrthosiphon pisum* em dieta artificial contendo 500 µg.mL⁻¹ de CFL, Dgui, DGL, Dros, DVL e Dvir.

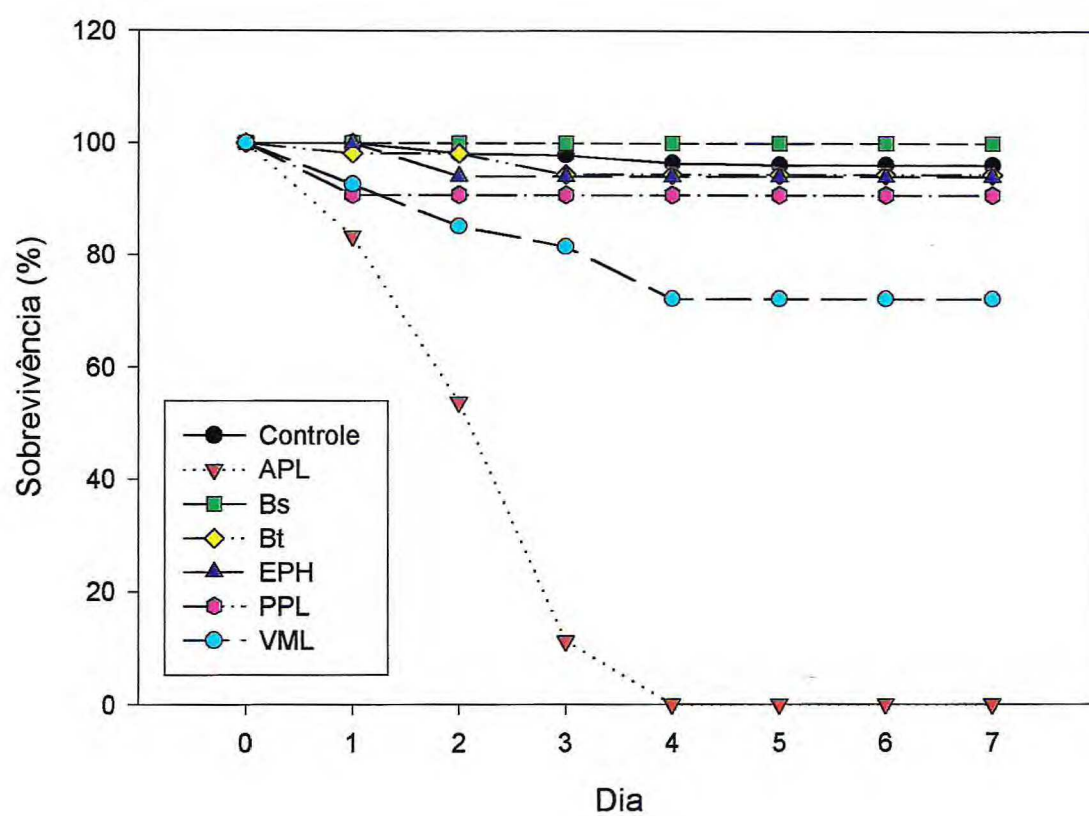


FIGURA 7. Sobrevivência das ninfas de *Acyrthosiphon pisum* em dieta artificial contendo $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de APL, Bs, Bt, EPH, PPL e VML.

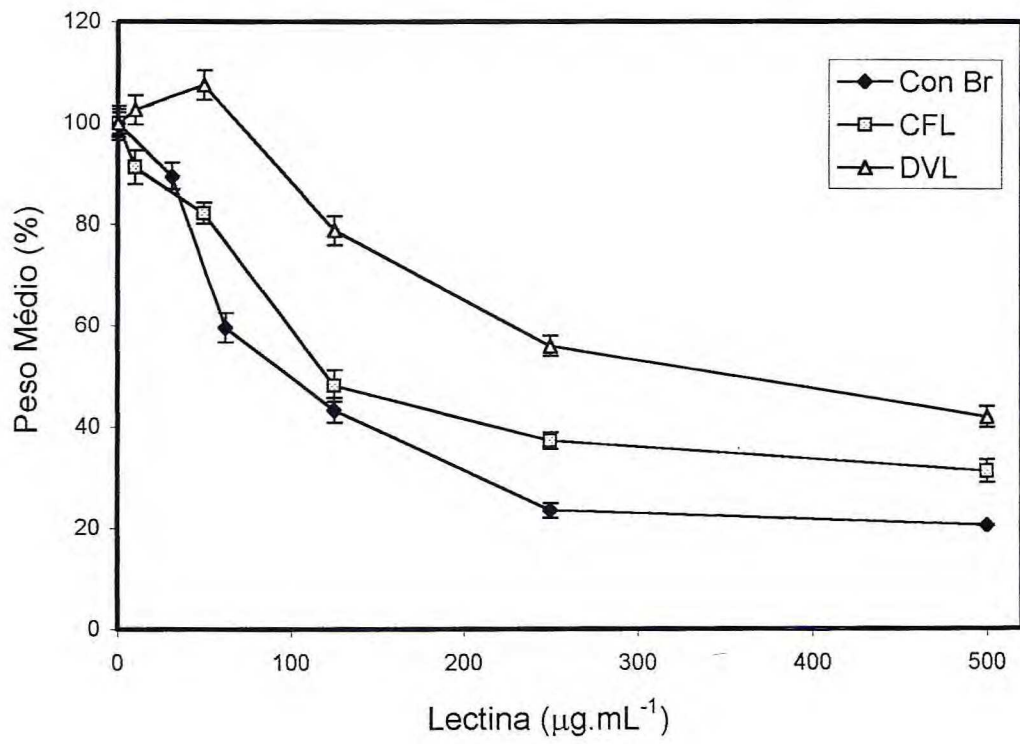


FIGURA 8. Efeitos da Con Br, CFL e DVL sobre o desenvolvimento ninfal de *Acyrthosiphon pisum*.

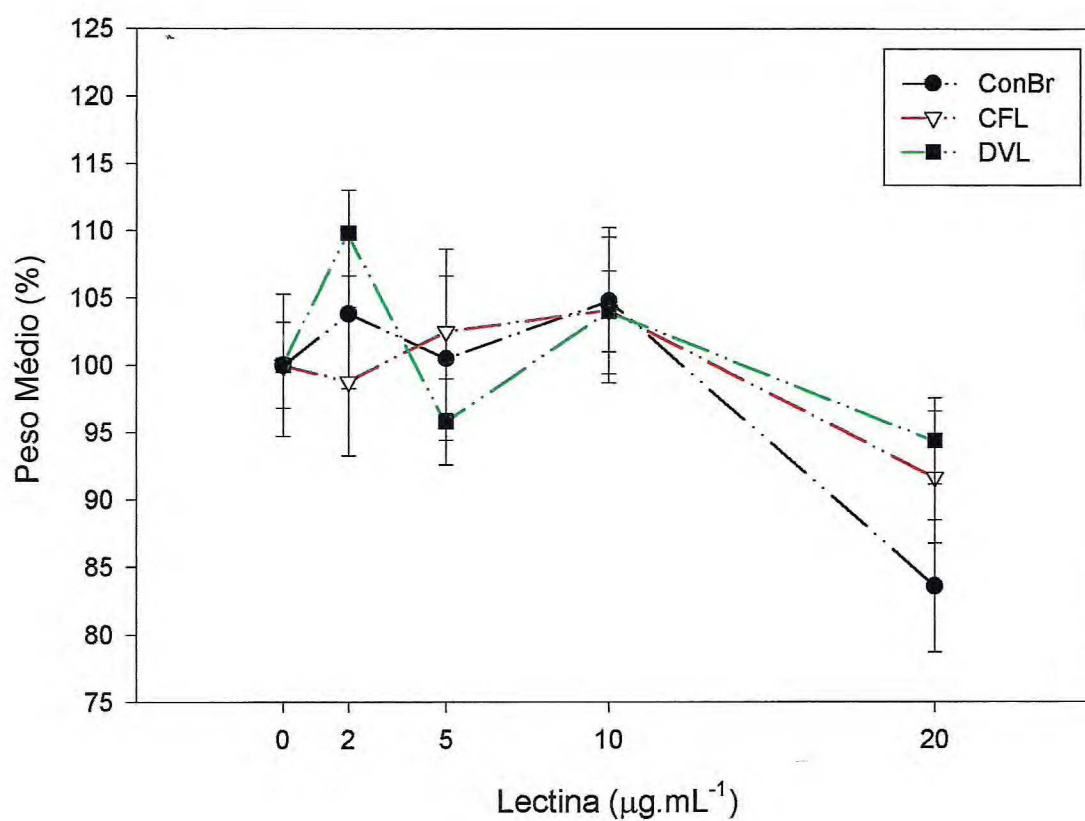


FIGURA 9. Efeitos da Con Br, CFL e DVL à doses subletais sobre o desenvolvimento ninfal de *Acyrthosiphon pisum*.

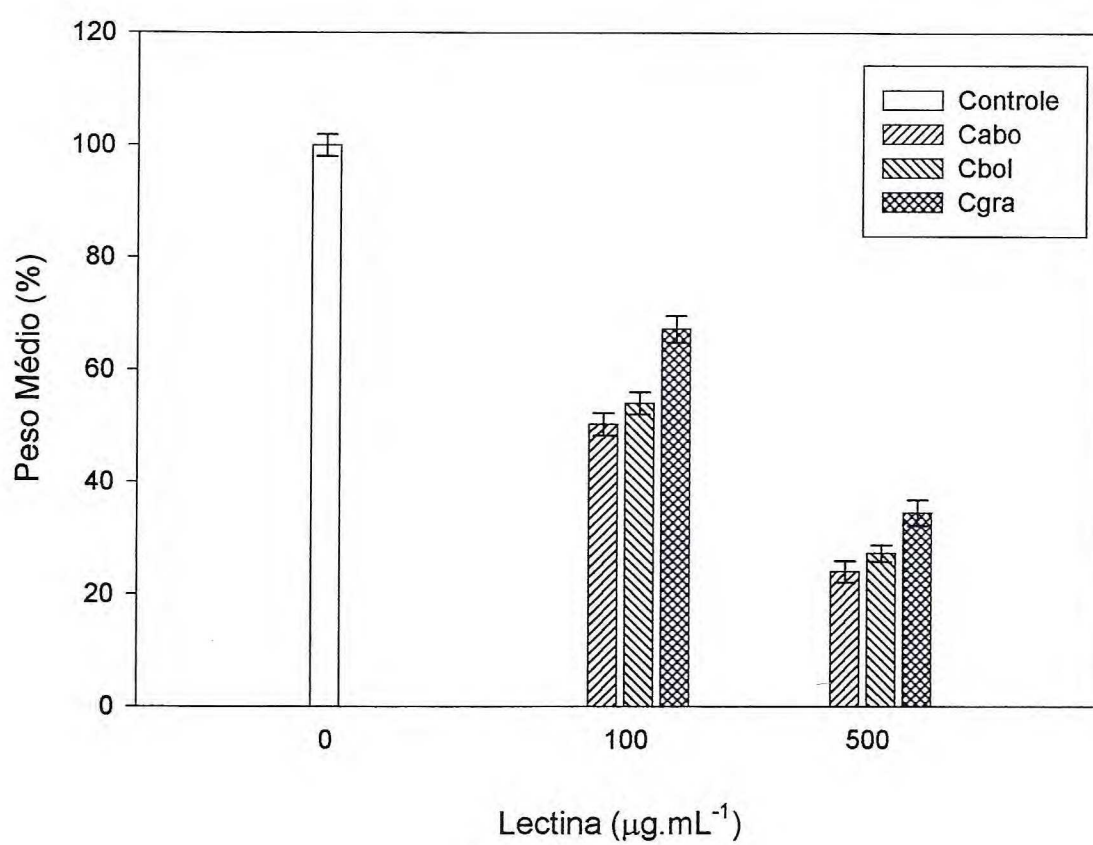


FIGURA 10. Efeitos da Cabo, Cbol e Cgra sobre o desenvolvimento ninfal de *Acyrthosiphon pisum*.

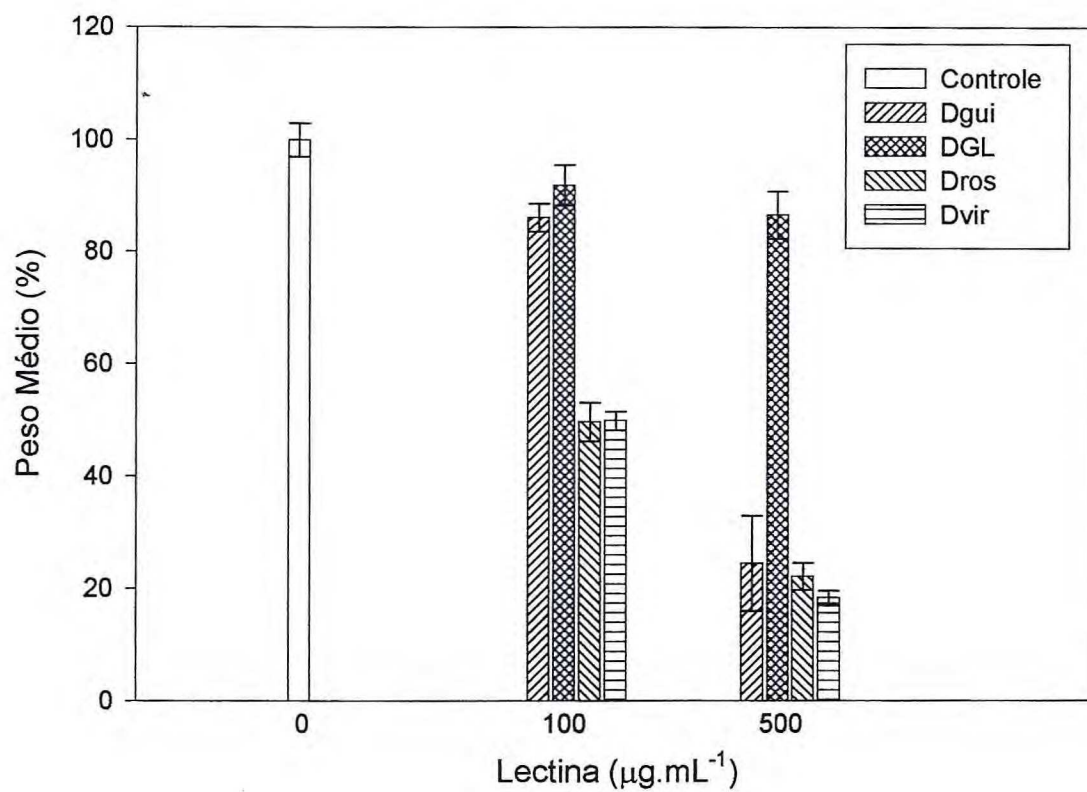


FIGURA 11. Efeitos da Dgui, DGL, Dros e Dvir sobre o desenvolvimento ninfal de *Acyrthosiphon pisum*.

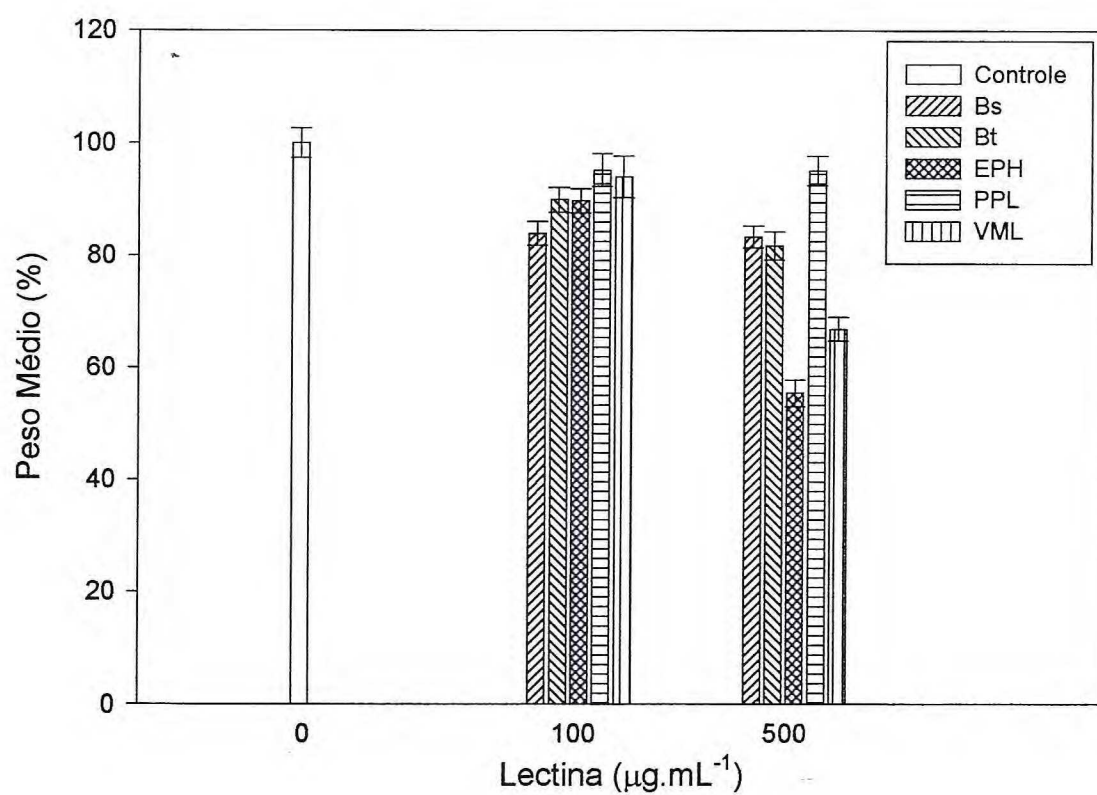


FIGURA 12. Efeitos da Bs, Bt, EPH, PPL e VML sobre o desenvolvimento ninfal de *Acyrthosiphon pisum*.

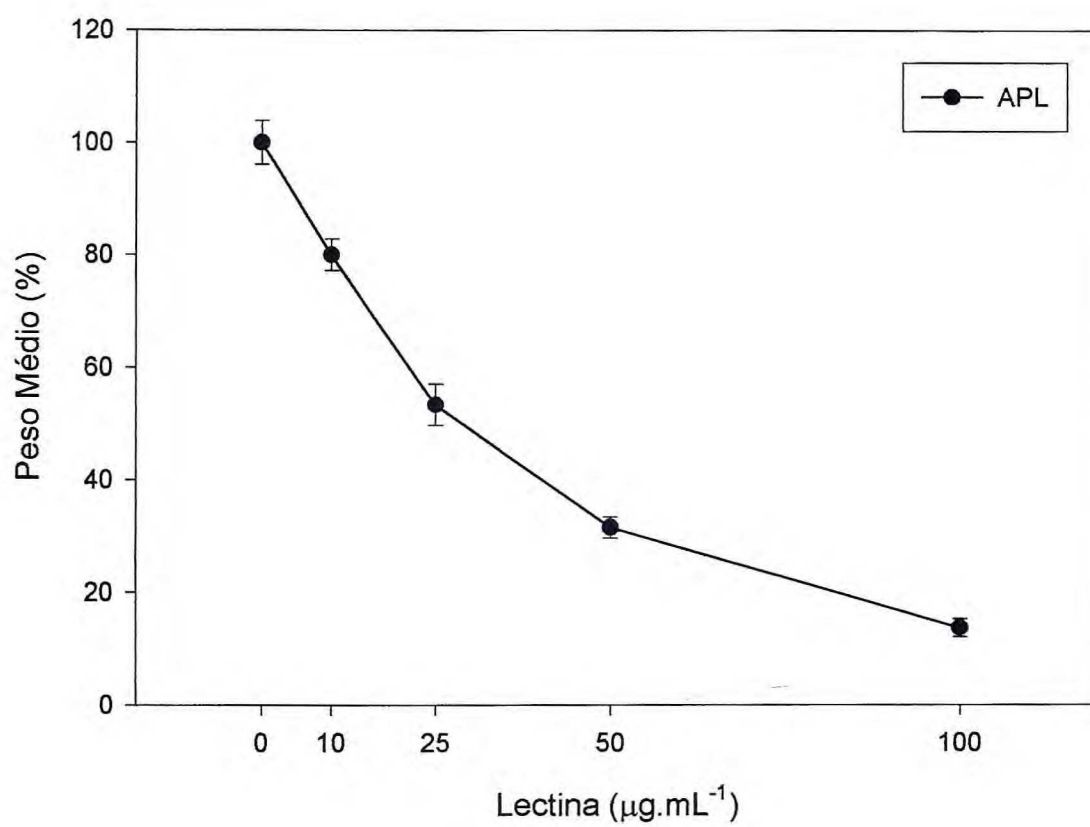


FIGURA 13. Efeitos das diferentes concentrações de APL sobre o desenvolvimento ninfal de *Acyrthosiphon pisum*.

TABELA 4. Toxicidade oral de lectinas expressas em IC e LC contra o *Acyrtosiphon pisum*.

Lectina	Mortalidade		Inibição de Crescimento		
	LC50 ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Int. de Confiança ($p=0,05$)	IC20 ^b ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC50 ^b ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Máx. Inib. de Crescimento (%) ^c
APL	20,88	n.d.	0,42	1,93	100,0
Bs	n.l.	-	n.i.	n.i.	16,7
Bt	n.l.	-	869	n.i.	18,3
Con Br	289	216-386	29	110	76,5
Cabo	312	220-443	22	102	75,9
Cbol	390	200-756	26	122	72,6
Cgra	n.l.	-	49	223	72,5
CFL	383	329-446	40	158	68,8
DGL	>1000	-	n.i.	n.i.	13,4
Dgui	222	168-293	n.d.	n.d.	75,5
Dros	67	n.d.	23	100	77,8
DVL	537	426-676	116	414	58,1
Dvir	163	114-232	24	101	81,6
EPH	n.l.	-	202	577	44,5
PPL	n.l.	-	n.i.	n.i.	8,5
VML	n.l.	-	294	806	33,1

^a Dose necessária para matar 50 % da população inicial após 7 dias mantida em dieta à 20 °C.

^b Dose necessária para reduzir o peso da população em 20 % e 50 %.

^c Máxima inibição do crescimento observada nas concentrações testadas $\leq 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, relativas ao controle e expressas em %.

n.l.: não letal - n.i.: não inibitória - n.d.: não determinada.

4.2 - EFEITOS DA CON BR SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE ADULTOS DO *Sitophilus oryzae*.

Em bioensaio com o gorgulho do arroz, *S.oryzae*, a Con Br foi adicionada a dieta artificial na concentração de 0,3 % (p/p). O efeito desta lectina sobre a sobrevivência de adultos foi observada diariamente durante 14 dias e ao final deste período constatamos que esta lectina não foi letal ao inseto (FIGURA 14). Também analisamos os efeitos deletérios da Con Br sobre a oviposição e desenvolvimento de larvas de *S.oryzae*. Entretanto, o modelo de utilizado para ensaio não foi adequado apresentando baixa taxa de emergência para o controle desta forma invalidando o ensaio (dado não mostrado).

4.3 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DE LECTINAS PELA ADIÇÃO DE AÇÚCAR OU DESMETALIZAÇÃO COM EDTA.

A inibição da atividade inseticida de lectinas pela adição de açúcar inibidor foi realizada utilizando o pentasacarídeo manotriose bis N-acetilglucosamil foi realizada através da sua adição à dietas artificiais. A Con Br e a Con A foram utilizadas nas doses correspondentes a IC₅₀ de cada uma. A presença do açúcar não foi suficiente para inibir a atividade deletéria das lectinas, além disto um efeito fagoestimulante provocado pelo açúcar foi observado (FIGURA 15). Em ensaio posterior, o efeito letal inerente a Con Br na concentração de 500 µg.mL⁻¹ foi retardado devido a desmetalização da proteína (FIGURA 16).

4.4 - COMPORTAMENTO DA CON BR APÓS INGESTÃO PELO *Acyrtosiphon pisum*.

Na análise eletroforética dos tratos digestivos de *A.pisum* alimentados com ConBr, a diferentes concentrações observamos que a lectina (assinalada com flecha) acumula-se, de maneira crescente ao aumento na dose de Con Br, nos tratos digestivos permanecendo intacta (FIGURA 17).

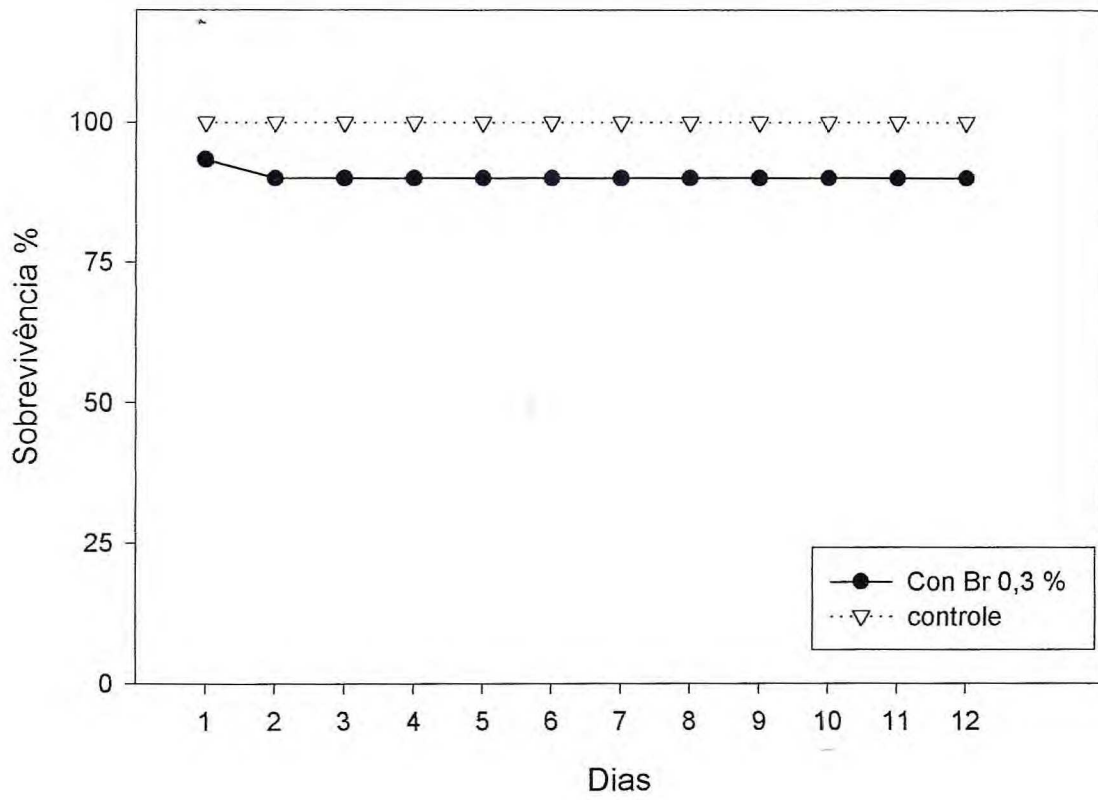


FIGURA 14. Efeito da Con Br sobre a sobrevivência de adultos de *Sitophilus oryzae*.

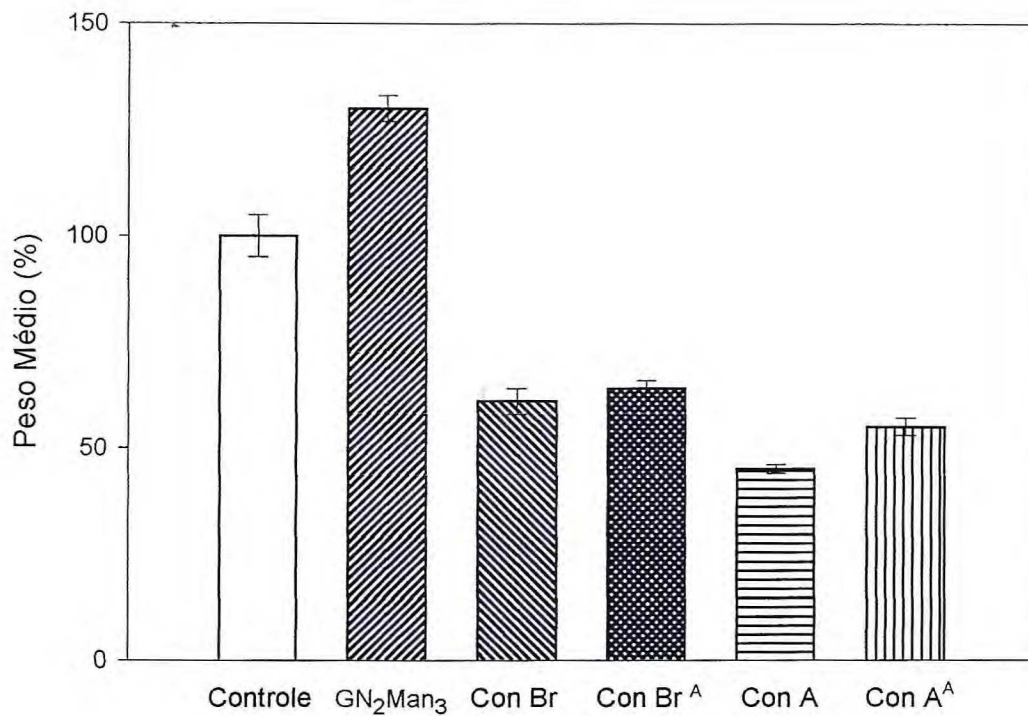


FIGURA 15. Ensaio de inibição por açúcar da Con Br e Con A.

Bioensaios foram conduzidos com ninfas recém-nascidas de *A. pisum* em dieta artificial ($n = 3 \times 18$) contendo Con A e Con Br nas concentrações correspondentes à IC_{50} (160 e 110 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e o GN₂Man₃, manotriose bis N-acetilglucosamil (20 μM). **Controle** (dieta artificial); **Açúcar** (dieta artificial + GN₂Man₃); **Con Br** (dieta artificial + Con Br); **Con Br^A** (dieta artificial + Con Br + GN₂Man₃); **Con A** (dieta artificial + Con A); e, **Con A^A** (dieta artificial + Con A + GN₂Man₃).

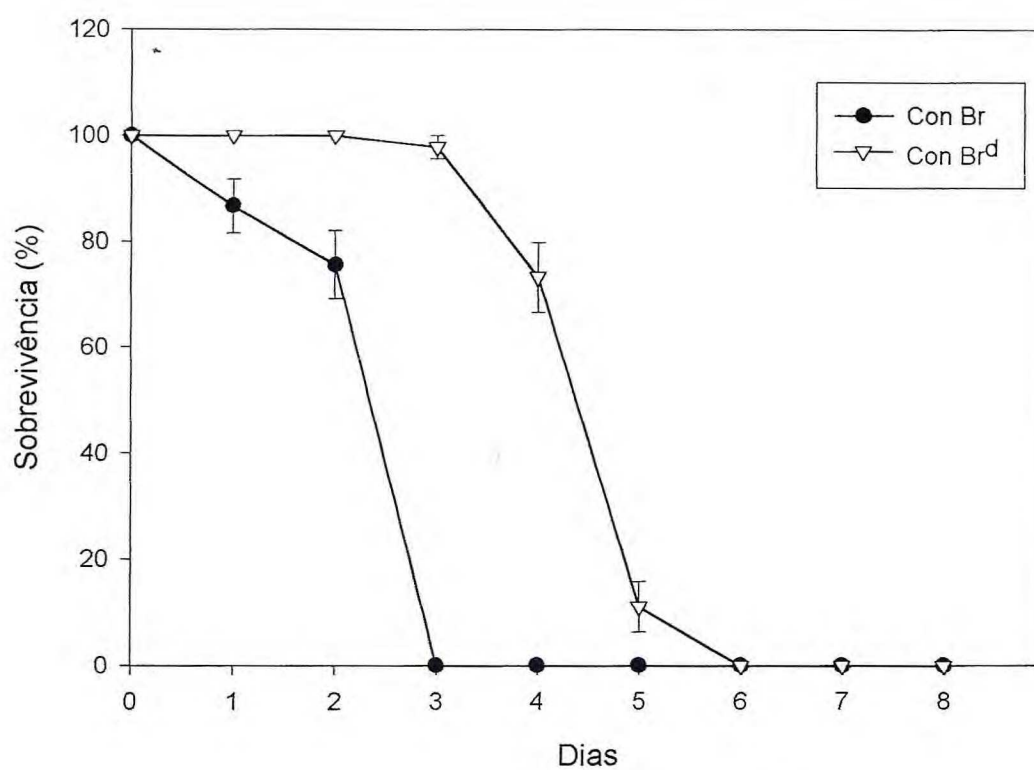


FIGURA 16. Ensaio de inibição da atividade tóxica da Con Br à dose de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na sobrevivência de ninfas de *Acyrthosiphon pisum*.

Bioensaio "in vitro" através da administração oral de Con Br (**Con Br**) via dieta artificial e Con Br desmetalizada (**Con Br^d**) via dieta artificial desprovida de metais, respectivamente.

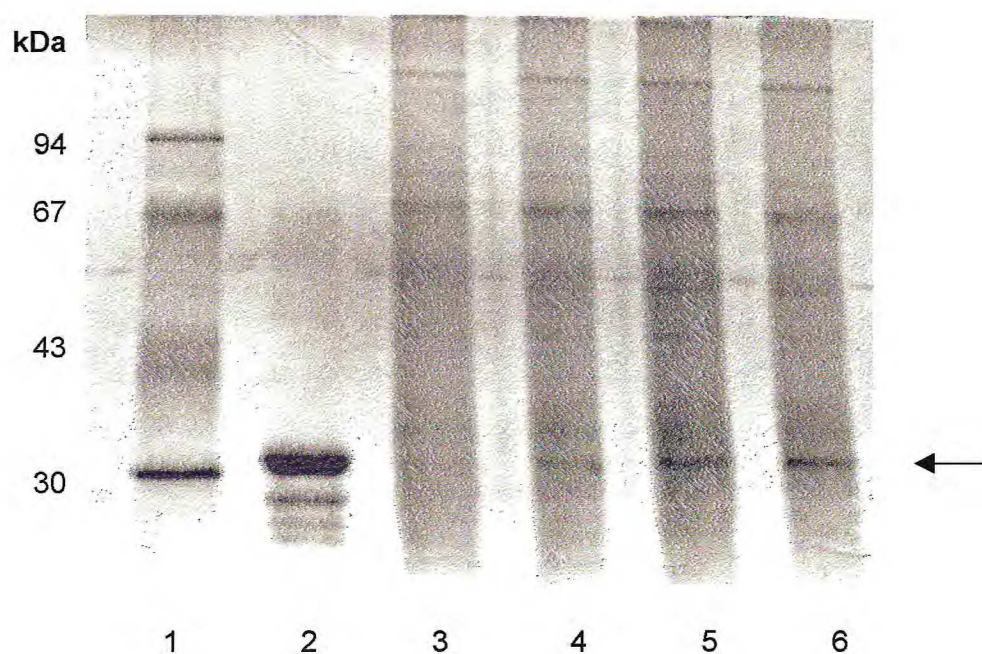


FIGURA 17. Análise eletroforética das proteínas de tratos digestivos de adultos de *Acyrthosiphon pisum* alimentados com dieta artificial contendo Con Br a diferentes concentrações.

Separadas em PAGE - SDS (10%) sob condições desnaturantes, as proteínas foram reveladas com Azul de Coomassie 0,1 %. Marcadores de massa molecular (fosforilase b, 94,0 kDa, albumina sérica bovina, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa) (1), Con Br (2), tratos digestivos de adultos mantidos em dieta controle (3) e dietas contendo Con Br nas concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (4), $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (5) e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (6).

4.5 - IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE ALVOS MOLECULARES DO TRATO DIGESTIVO DE *Acyrtosiphon pisum*.

4.5.1 - Lectin Blot de Proteínas do Trato Digestivo de *A.pisum*

Na FIGURA 18, podemos visualizar o Lectin Blot utilizando as lectinas de monocotiledôneas (GNA, LOA e AMA) e as lectinas de Diocleinae (Con A, Con Br, CFL e DVL). Todas as lectinas reconhecem várias glicoproteínas do trato digestivo de *A.pisum*. As lectinas de monocotiledôneas ligam-se preferencialmente à glicoproteínas de massa molecular acima de 78 kDa enquanto as Diocleinae ligam-se à glicoproteínas de massa moleculares variadas. Diferenças no reconhecimento são observadas entre a GNA e as outras lectinas de Monocotiledôneas, LOA e AMA. Estas lectinas, LOA e AMA, não são capazes de reconhecer ou reconhecem fracamente uma banda protéica (assinalada com flecha) comum a GNA e as lectinas da subtribo Diocleinae.

4.5.2. Cromatografia de Afinidade em Con Br-Agarose e PAGE 2D

A fração rica em proteínas de membrana, solubilizadas de tratos digestivos, após ser submetida a cromatografia em coluna de Con Br-Agarose apresenta 3 picos (FIGURA 19). O primeiro pico (pI), correspondendo a fração não-retida, foi eluído com o tampão de equilíbrio. Seguido da aplicação de α -metil-D-manosídeo nas concentrações de 0,1 M e 0,5 M, foram eluídos o pII e o pIII. O pIII foi escolhido para separação em eletroforese bidimensional. Na FIGURA 20 podemos observar que várias glicoproteínas com diferentes pontos isoelétricos - pI e massas moleculares foram reconhecidas pela Con Br imobilizada. Os três spots indicados com setas foram escolhidos para serem identificados.

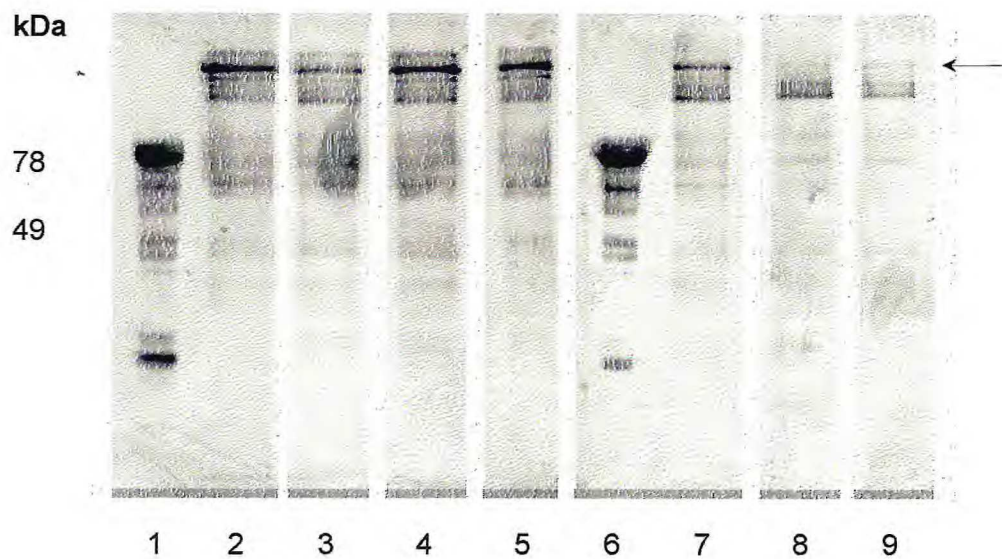


FIGURA 18. Lectin blot de proteínas do trato digestivo de *Acyrtosiphon pisum* marcadas com lectinas conjugadas com biotina.

Alíquotas idênticas de proteínas membranares, solubilizadas de tratos digestivos do pulgão, foram separadas paralelamente em PAGE-SDS (10%) e transferidas à membrana de nitrocelulose, em seguida foram submetidas à Lectin Blot com nove lectinas marcadas com biotina. Marcadores de massa molecular (lactotransferina bovina, 78kDa; carboxipeptidase Y, 49kDa) (1, 6), reconhecimento 14 de proteínas membranares através de Con Br-biotina (2), CFL-biotina (3), Con A-biotina (4), DVL-biotina (5), GNA-biotina (7), AMA-biotina (8) e LOA-biotina (9).

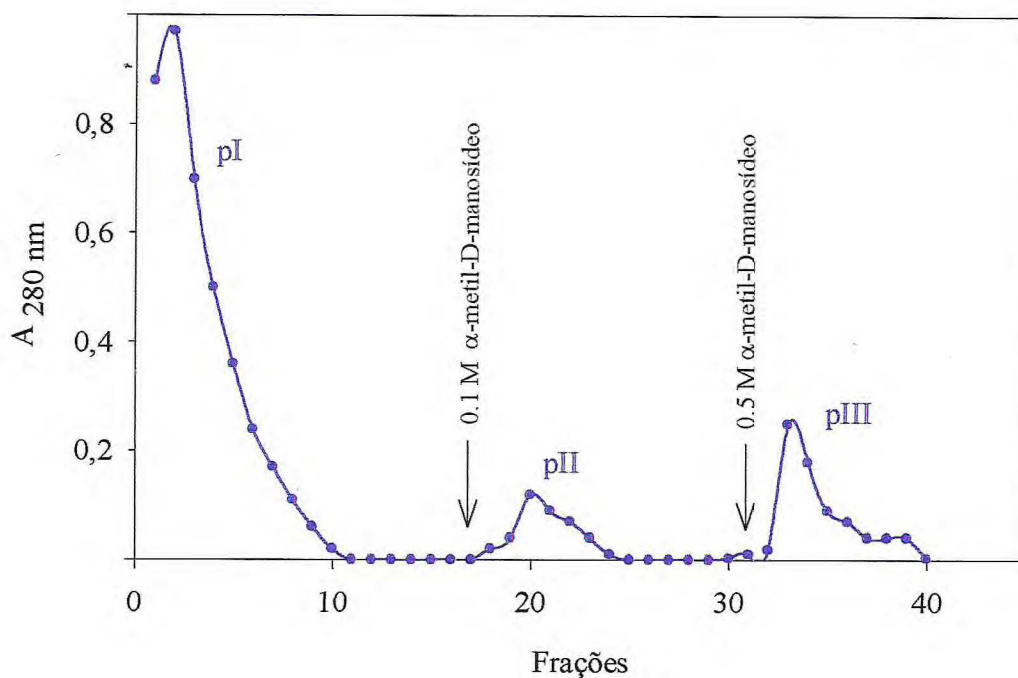


FIGURA 19. Cromatografia de afinidade em coluna de Con Br-Agarose de proteínas membranares solubilizadas do trato digestivo de *Acyrtosiphon pisum*.

A coluna de Con Br-Agarose (0,8 cm × 2,0 cm) foi equilibrada em TEE contendo $MnCl_2$ 0,1 mM e $CaCl_2$ 1 mM ao fluxo de 20 mL/h à 4 °C. O pII e o pIII foram eluídos no tampão de equilíbrio contendo α -metil-D-manosídeo nas concentrações de 0,1 e 0,5 M, respectivamente. Em seguida, as frações foram dialisadas contra H_2O destilada, concentradas e estocadas até sua eventual utilização a - 20 °C.

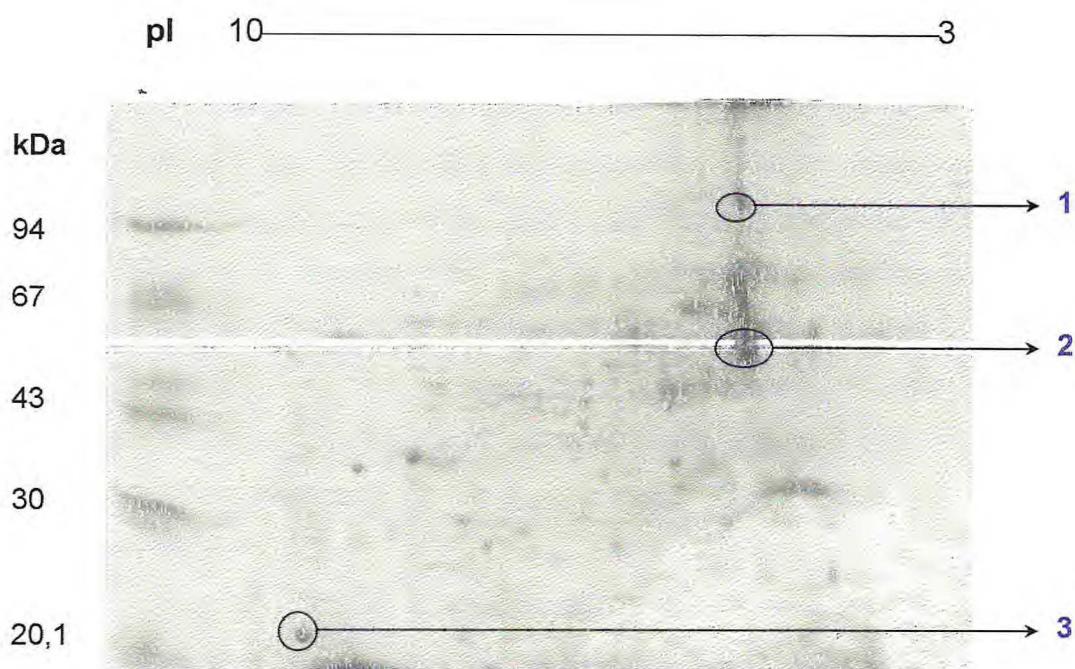


Figure 20. Eletroforese bidimensional do pIII da cromatografia de afinidade em Con Br-Agarose.

O pIII foi dissolvido em solução de amostra (IPG Buffer 3-10 0.4 %, DTT 10 mm, Triton X-100 0.4 %, tio-uréia 2 M, uréia 7 M, CHAPS 4 %), aplicado em Immobiline DryStrip Gel pH 3-10NL (7 cm, Pharmacia LKB) e submetido a focalização isoelétrica (IEF). Em seguida, o PAGE-SDS (10%) foi realizado sob condições desnaturantes e revelado com Amido Black 0,3 %. Os "spots" assinalados (1, 2 e 3) foram separados do gel e identificados segundo suas seqüências protéicas parciais.

4.5.3 – Sequenciamento de Proteínas

Os spots 1, 2 e 3 foram submetidos a microsequenciamento interno de proteínas seguindo o procedimento experimental descrito no item 3.3.9.

O spot 1 referente a uma glicoproteína de massa molecular aparente de 120 kDa e pI 5,0 após ser submetido a digestão enzimática foi separado através de HPLC (dado não mostrado). O pico 9 foi o escolhido para sequenciamento donde a partir dele pode-se fazer a leitura de 11 resíduos de aminoácidos (AGAMN~~W~~GMNXYK). Na FIGURA 21, o alinhamento múltiplo desta sequência com as seqüências de aminopeptidases de outros insetos pode ser observado.

O spot 2 corresponde a uma glicoproteína de massa molecular aparente em torno de 60 kDa e pI 5,0. Após ser submetido a digestão enzimática e separação em HPLC (dado não mostrado), 4 picos (60pico13, 60pico13c, 60pico16 e 60pico19) foram sequenciados. O alinhamento múltiplo destas seqüências mostrou homologia com a proteína externa de membrana F (Oprf) de bactérias do gênero *Pseudomonas* (FIGURA 22).

O spot 3 refere-se a uma glicoproteína de massa molecular aparente em torno de 22 kDa e pI 9,0. Após digestão e separação em HPLC, o pico 10 do perfil cromatográfico (dado não mostrado) foi sequenciado permitindo a leitura de 16 resíduos de aminoácidos (GVTAVSADGLAGGATK). Submetida a alinhamento, nenhuma homologia com seqüências disponíveis nos bancos de dados foi observada. Devido a um problema técnico o restante do pico 10 foi perdido não permitindo a continuação da leitura, assim como nenhum outro pico resultante do HPLC pode ser sequenciado.


```

AMPN_Apisu                                     A 1
AMPN_Bmori  TTVTSTYAVSHYTVVSTNNNARDYARNNVGRTGDWSGKAMA-YTTYTMANNMKAADSA 216
AMPN_Msext  DTVMSTYAYVSNNYNSNY-----RVYSRGTNTAA-GNMA--YT--YAKDKA-AVDAA 190
AMPN_Pluxy  DTVMSSYAYVSKDYSNNNTYDKS-MKVS RGTNTAADGKNMVKYT--YAKDKV-AVDAA 194
AMPN_Helvi  TTTMSTYA-VSYTSATNAAGHVA-RGANN GAVYARVGAAMSDHTGDYADNKMTAADGA 226

AMPN_Apisu  GAMNWGMNXYK                                     10
AMPN_Bmori  GAMNWGTYRAYDNSNHYKRVANVAH--AHMWGNVTCAWWDNWN GARYYYTASVAGYTR 272
AMPN_Msext  GAMNWGVYRVAVRGVTTT SVKNGRCHNTHMWGNV GMSWTYTWNGANNYATDVRWRMMD 248
AMPN_Pluxy  GAMNWGVYRAV--GVTTTS-TGGRSHNTH-WGNV GDSWTYTWNGANS-ATDV-WRMMD 246
AMPN_Helvi  GAMNWGTYRAY---YDHTNSY-KAYSHAHMWGNV TNAWWDVWNGARYYYTAWVDGA-T 279

```

FIGURA 21. Alinhamento múltiplo de uma seqüência interna da aminopeptidase de *Acyrtosiphon pisum*.

O alinhamento múltiplo foi realizado com o programa PepTool Lite 1.1. Uma seqüência interna do "spot" 1, denominada acima **AMPN_Apisu**, possui a seguinte seqüência **GAMNWGMNXYK** onde X refere-se a um resíduo não identificado. As outras seqüências são aminopeptidases de insetos disponibilizadas na internet (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>), são elas: **AMPN_Bmori** de *Bombix mori*, **AMPN_Msext** de *Manduca sexta*, **AMPN_Pluxy** de *Plutella xylostella*, **AMPN_Helvi** de *Heliothis virescens*. Os números correspondem aos resíduos de aminoácidos em cada linha. Os aminoácidos conservados são mostrados em amarelo e azul.

	1	80
60pic13	(1) -----	
60pic19	(1) -----	
60pic13c	(1) -----KQGQGAVEGELFYF-----	
60pic16	(1) -----	
Oprf-PseuRes	(1) MKLKNTLGVAVGSIVAALSMNALAQGGAVEVEAFGKRYFTDSSRSLED-GNLYGGSVGYLTDDVSLALSIGEYHDMTS	
Oprf-PseuAe	(1) MKLKNTLGVVIGSLVAASAMNAFAQQNSVEIEAFGKRYFTDSVRNMKN-ADLYGGSIGYELTDDVELALSIGEYHDVVRG	
OprF-Pseufluo	(1) MKLKNTLGFATGSLIAATSFGALAQGGAVEIEGFATKEQFDSARNFKNNGNLFGGSVGYELTDDVELRLAYDEVHNART	
Oprfpre-Pseusyr	(1) MKLKNTLGLAIGTIVAATSFGALAQGGAVEIEGFATKEMYDSARDFKNNGNLFGGSIGYELTDDVELRLGYDEVHNVRS	
Consensus	(1) MKLKNTLG IGSLVAA S A AQGGAVEIEAFATK DS R G LFGGSIGYFLTDDV L L Y E H	
	81	160
60pic13	(1) -----	
60pic19	(1) -----	
60pic13c	(15) -----	
60pic16	(1) -----	
Oprf-PseuRes	(80) DDAFGVDGHKDIKGLASLDAVYHFGTPGVGLRPYVSGGFAHQSI SNIPDRS-GRDHSTFANVGTGLKYYFTENFFAKAS	
Oprf-PseuAe	(80) TYETG---NKKVHGNTSLDALYHFGTPGVGLRPYVSAGLAHQINITNINSDSQGRQMTMANIGAGLKYFTENFFAKAS	
OprF - Pseufluo	(81) DDGTN-----VKGANTALDALYHFNNPGDMLRPYVSAGFSDQSIDQNGSNG--RNRSTFANVGGGAKLYFTENFYARAG	
Oprfpre-Pseusyr	(81) DDGKN-----IKGADTALDALYHFNNPGDMLRPYVSAGFSDQSIGQNGRNG--RNGSTFANIGGGPKLYFTDNFYARAG	
Consensus	(81) I G ALDALYHF PG LRPYVSAG A Q I N R T ANIG G K YFTENFFAKA	

FIGURA 22. Alinhamento múltiplo de quatro seqüências internas de uma proteína do trato digestivo de *Acyrtosiphon pisum*.

O alinhamento múltiplo foi realizado com o programa Vector NTI 5.5. Quatro seqüências internas provenientes da proteína denominada "spot" 2, foram determinadas, são elas: **60pico13**, **60pico13c**, **60pico16**, **60pico19**. As outras seqüências são de OprFs de bactérias do gênero *Pseudomonas* disponibilizadas na internet (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>), são elas: **Oprf-PseuRes** de *Pseudomonas resinovarsis*, **Oprf-PseuAe** de *P.aeruginosa*, **OprF-Pseufluo** de *P.fluorescens*, **Oprfpre-Pseusyr** de *P.syringae*. Os números correspondem aos resíduos de aminoácidos em cada linha. Os aminoácidos conservados são mostrados em azul e cinza.

		161		240
60pic13	(1)	-----	-----	-----
60pic19	(1)	-----	-----	-----
60pic13c	(15)	-----	-----	-----
60pic16	(1)	-----	-----	-----
Oprf-PseuRes	(159)	LDGMYNLDAQES---EWMAGVGVGVNFGGSTKQEPAPAPV-AEVCADSDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDADGCPAVAE		
Oprf-PseuAe	(157)	LDGQYGLEKRDNGHQGEWMAGLGVGFNFGGS-KAAPAPEPV-ADVCSDSNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDANGCPAVAE		
OprF-Pseufluo	(153)	VEAQYNIDQGD---EWAPSVGIGVNFSGGSKPAAAPVPAPAEVCSDSNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDADGCPAVAE		
Oprfpre-Pseusyr	(153)	VEAQYNIDQGD---EWAPSVGIGVNFSGGSKKVEAAPAPVAEVCSDSDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDADGCPAVAE		
Consensus	(161)	LDA Y ID D EW VGIG NFGG K A AEVCSDSDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDA GCPAVAE		
		241		320
60pic13	(1)	-----	KFDRSLPHVNVGTIGHVDHGKT	-----
60pic19	(1)	-----	-----	-----
60pic13c	(15)	-----	-----	-----
60pic16	(1)	-----	-----	DGVAPSR
Oprf-PseuRes	(234)	VVRVELDVKFDFDKAKVKEESYGDINKNLADFMQYPTTTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRADAVRDVLVDQYGVGSER		
Oprf-PseuAe	(235)	VVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADINKNLADFMQYPTSTTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVNEYGVGGR		
OprF-Pseufluo	(229)	VVRVELDVKFDFDKSVVKENSYGDINKNLADFMQYPTSTTTVEGHTDSVGPDAYNQKLSERRANAVKQVLTNQYGVSSR		
Oprfpre-Pseusyr	(229)	VVRVELDVKFDFDKSVVKPNSYGDINKNLADFMQYPTTTTVEGHTDSVGPDAYNQKLSERRANAVKQVLTNQYGVGASR		
Consensus	(241)	VVRV LDVKFDFDKS VK SYGDINKNLADFM QYP TSTTVEGHTDSVG DAYNQKLSERRA AVK VL YGV R		
		321		356
60pic13	(23)	-----	-----	-----
60pic19	(1)	-NALDF-----	-----	-----
60pic13c	(15)	-----	-----	-----
60pic16	(8)	VIAVGYGE-----	-----	-----
Oprf-PseuRes	(314)	VNAVGYGETRPVADNATADGRAVNRV-----	-----	-----
Oprf-PseuAe	(315)	VNAVGYGESRPVADNATAEGRANRRVEAEVEAEAK		
OprF-Pseufluo	(309)	VQSVGYGESRPVADNATDAGRAVNRVVEAQVEAQAK		
Oprfpre-Pseusyr	(309)	VNSVGYGESKRPVADNATEAGRAVNRVVEAEVEAQAK		
Consensus	(321)	VNAVGYGESRPVADNAT GRAVNRV		

FIGURA 22. Continuação.

4.6 – CLONAGEM DE UMA AMINOPEPTIDASE DE TRATOS DIGESTIVOS DE *Acyrtosiphon pisum*

O cDNA de *A.pisum* construído a partir do ARN mensageiro de tratos digestivos de insetos adultos foi utilizado como substrato na amplificação do gene da aminopeptidase reconhecida pela Con Br. A amplificação por PCR como descrito no item 3.4.4 foi realizada com oligonucleotídeos desenhados a partir do alinhamento múltiplo de sequências de DNA de aminopeptidase de diferentes organismos. Dos 3 pares de oligonucleotídeos utilizados em PCR somente 1 foi capaz de amplificar a diferentes concentrações de cDNA uma única banda em torno de 500 pb sob as condições testadas (FIGURA 23, poços 7-11).

O fragmento amplificado por PCR foi purificado e clonado no vector pMosblue (FIGURA A2). Os clones positivos foram escolhidos aleatoriamente e verificados para confirmação do inserto através de eletroforese cuja presença do inserto foi verificado em 13 clones (FIGURA 24). Dentre os treze, cinco clones (2, 6, 11, 22) foram os escolhidos para sequenciamento. A seqüência referente a 527 pb do clone 11 pode ser vista na FIGURA 25, com sua respectiva de seqüência de aminoácidos deduzida.

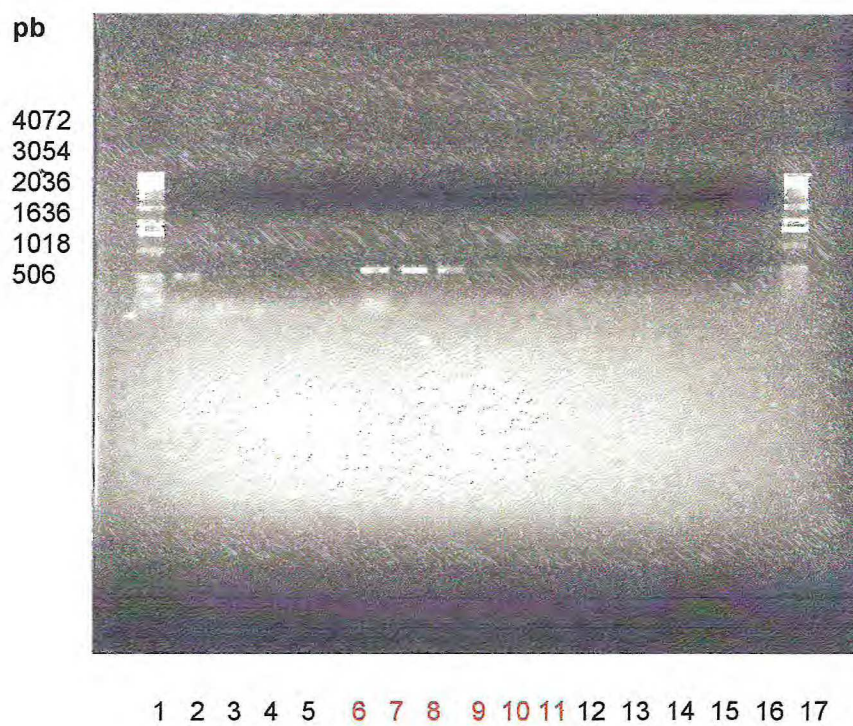


FIGURA 23. Eletroforese em gel de agarose 1 % do gene da aminopeptidase amplificado por PCR.

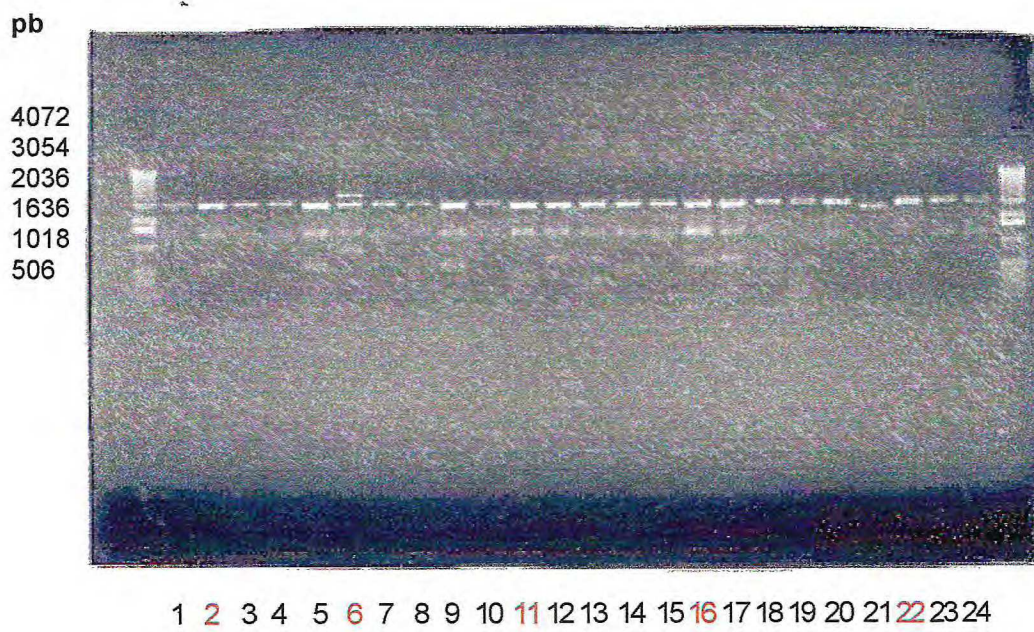


FIGURA 24. Eletroforese em gel de agarose 1 % de plasmídeos recombinantes DH5 α expressando o gene da aminopeptidase amplificado por PCR.

TTC	CCG	TGC	TGT	GAT	GAG	CCT	ATG	TAC	AAG	GCC	AAG	TTT	AAC	ATA
F	P	C	C	D	E	P	M	Y	K	A	K	F	N	I
ACG	GTG	GTG	AAG	CAA	AAT	GGT	CAG	ACG	GTA	TTG	TCC	AAT	ATG	CCA
T	V	V	K	Q	N	G	Q	T	V	L	S	N	M	P
ATC	CTA	AAA	ATC	GAA	GAA	GGT	CCA	AAA	AAC	ACC	ACT	GTT	TAC	TTC
I	L	K	I	E	E	G	P	K	N	T	T	V	Y	F
AAA	GAA	ACT	CCG	CCG	ATG	TCC	ACT	TAC	TTG	GCG	GCC	ATT	TAT	GTG
K	E	T	P	P	M	S	T	Y	L	A	A	I	Y	V
GGT	GAA	TTC	GTG	CCA	AAC	AAA	AAT	GAT	TCA	AAA	ATA	ACA	ATT	TAT
G	E	F	V	P	N	K	N	D	S	K	I	T	I	Y
ACA	TAC	AAA	GGA	AAG	CAG	GGT	CAA	ACT	GAA	TAT	GTA	GCA	ACC	GAA
T	Y	K	G	K	Q	G	Q	T	E	Y	V	A	T	E
GCT	CCA	AAA	CAC	CTC	AAA	GTG	CTG	GAG	AAG	TAC	ACG	GGC	ATC	AAT
A	P	K	H	L	K	V	L	E	K	Y	T	G	I	N
TAC	ATG	CTT	CCC	AAA	ATG	GAT	CTG	TTG	GCG	ATA	CCC	GAT	TTC	CGT
Y	M	L	P	K	M	D	L	L	A	I	P	D	F	R

Figure 25. Seqüência nucleotídica parcial com seqüência de aminoácidos deduzida, de uma aminopeptidase de *Acyrtosiphon pisum*.

5 - DISCUSSÃO

O pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum*, é geralmente encontrado na Europa e Estados Unidos colonizando espécies de leguminosas como a alfafa, o trevo e a ervilha. Este afídeo causa sérias perdas na produção agrícola consequência direta da sua alta taxa de reprodução, entre outros fatores. Devido a importância econômica de suas plantas hospedeiras, a busca por novos métodos de controle tem sido a preocupação principal de vários centros de pesquisa (HILL, 1987).

O levantamento da atividade biológica de lectinas da subtribo Diocleinae sobre o *A.pisum* mostrou que das nove lectinas analisadas, somente a lectina de *Dioclea grandiflora* (DGL) não apresentou nenhum efeito tóxico ao pulgão quando observado os parâmetros sobrevivência e crescimento de ninfas. Entre as mais tóxicas estão a Con Br e as lectinas de *Canavalia bonariensis* (Cabo), de *C. aff.sp. boliviana* (Cbol), de *Dioclea virgata* (Dvir) e de *D.rostrata* (Dros) que, nas concentrações em torno de 100 a 122 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduziram o peso dos adultos em 50 %. A mais letal foi a Dros com uma LC_{50} de 67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As diferenças na atividade biológica deste grupo que destaca-se por suas seqüências primárias conservadas e similaridade em suas especificidades por açúcares simples, já foram observadas anteriormente para mamíferos (BARRALNETO *et al.*, 1992; RODRIGUES *et al.*, 1992; BENTO *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1999). Algumas hipóteses sobre a diferença na atividade biológica de lectinas têm sido propostas. Huesing e colaboradores (1991b) ao estudarem a atividade tóxica das aglutininas de gérmen de trigo, de *Oryza sativa* e de *Urtica dioica* sobre o *Callosobruchus maculatus*, sugeriram que o número de sítios de ligação à carboidratos seria o responsável pelas diferenças nos níveis de toxicidade entre lectinas com mesma especificidade e de estruturas moleculares correlacionadas. Esta hipótese está descartada para as lectinas da subtribo Diocleinae que comportam-se como tetrâmeros a pH 6,5, possuindo assim o mesmo número de sítios de ligação à carboidratos (CALVETE *et al.*, 1999). O valor de pH, citado acima, corresponde ao pH fisiológico do estômago de *A.pisum* (dado não

publicado). Uma outra explicação, a mais provável, é que as pequenas mudanças na orientação dos sítios de ligação à carboidratos, consequência das pontuais diferenças nas seqüências primárias das lectinas da subtribo Diocleinae, sejam responsáveis pelas diferenças na especificidade por carboidratos complexos e por conseguinte promovendo atividades biológicas distintas (SANZ-APARIZIO *et al.*, 1997; DAM *et al.*, 1998; DAM *et al.*, 2000). A ausência de toxicidade observada para a DGL, poderia ser justificada pelo fato da lectina reconhecer fracamente ou não reconhecer glicoconjugados, desta forma não conseguindo se fixar a membrana do trato digestivo permanecendo livre no lúmen onde estaria mais susceptível a degradação e/ou excreção.

Além das lectinas da subtribo Diocleinae, seis outras lectinas de diferentes tribos foram analisadas contra o *A. pisum*. Os cálculos da LC₅₀ e da IC₅₀ indicaram que as lectinas de *Bryothamnium seafortii* (Bs), *B. triquetrum* (Bt), *Ephedra twendianna* (EPH), *Vatairea macrocarpa* (VML) e *Parkia platycephala* (PPL) não são tóxicas ao *A. pisum*, nas concentrações máximas de 500 µg.mL⁻¹. Estas lectinas possuem uma especificidade variada por açúcares. A VML é inibida por galactose e derivados (CAVADA *et al.*, 1998), a EPH por mucina (SÉRVULO, 2001), as lectinas de algas (Bs e Bt) são por sua vez específicas para fetuína (AINOUZ *et al.*, 1995) e a PPL é manose/glicose específica (SANTOS *et al.*, 1992). A ausência de toxicidade de Bs, Bt, EPH e VML poderia ter sido prevista já que lectinas com especificidade para galactose e fetuína, testadas anteriormente, não demonstraram toxicidade contra o *A. pisum* (RAHBÉ *et al.*, 1995). Entretanto, a ausência de atividade para PPL foi uma surpresa, já que esta apresenta especificidade por resíduos de manose e glicose. Assim como para DGL, a PPL pode simplesmente não reconhecer a porção glicídica de moléculas de membrana no trato digestivo do afídeo, sendo incapaz de exercer qualquer atividade tóxica. Em estudo recente, a ligação desta lectina a receptores e sua especificidade fina por carboidratos foi determinada (BOMFIM, 2001). A PPL, assim como as lectinas da subtribo Diocleinae, reconhece trimanosídeos porém diferencia-se destas por ligar-se exclusivamente à pentamansídeos (Man5) que não possuem ligações α 1,2. Além disto, a PPL reconhece glicoproteínas como a avidina, a fetuína e a mucina de porco.

Dentre todas lectinas testadas, a RIP tipo 2 isolada de sementes de *Abrus pulchelus* (APL) foi a mais tóxica sendo capaz de matar 100 % da população

inicial no seu quarto dia de desenvolvimento com doses de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Devida a alta mortalidade, a IC_{50} só pode ser determinada com os dados de ensaio de inibição de concentrações baixas de proteína (10 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo observada uma perda máxima de $86,3\%$ no peso médio de pulgões adultos. A APL é específica por galactose e derivados, e aglutina hemácias de coelho. Além disto, exibe uma alta toxicidade para ratos ($\text{LC}_{50} = 31 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e para o microcrustáceo *Artemia salina* ($\text{LC}_{50} = 3,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (RAMOS *et al.*, 1998). Os efeitos citóxicos das RIPs tipo 2 em insetos vêm sendo demonstrados desde 1990 quando a toxicidade da ricina foi determinada para *C.maculatus* e *Anthonomus grandis*. Entretanto, nenhuma alteração no nível de mortalidade foi observada em *Spodoptera littoralis* e *Heliothis virescens* (GATEHOUSE *et al.*, 1990). A RIP tipo 2 extraída de *Eranthis hyemalis* mostrou-se tóxica a larva de *Diabrotica undecimpunctata* (KUMAR *et al.*, 1993), enquanto a cinamomina isolada de sementes da canforeira (*Cinnamomum camphora*) foi tóxica para *Helicoverpa armigera* e para o mosquito *Culex pipines pallens* (ZHOU *et al.*, 2000). A ricina, testada anteriormente contra o *A.pisum*, mostrou-se menos tóxica que a APL com uma LC_{50} de $118 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e inibição do crescimento em 60% nas doses máximas de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (RAHBÉ *et al.*, 1995). Está claro que a alta toxicidade da APL, assim como de outras RIPs tipo 2, está diretamente relacionada ao domínio de ação catalítica responsável este pela inativação de ribossomos em células eucarióticas e, de forma indireta, ao domínio lectínico responsável pela ligação da molécula à membrana celular permitindo assim a internalização do primeiro (HAUSNER *et al.*, 1987). Mesmo com a alta taxa de mortalidade celular provocada por algumas destas citotoxinas, as RIPs tipo 2 constituem um excelente modelo de estudo, podendo servir de veículo no transporte de moléculas para o interior de células ou na construção de proteínas quiméricas (SANDVIG & VAN DEURS, 2000).

A Con Br foi também testada em adultos do gorgulho do arroz, *Sitophilus oryzae*, mas não apresentou toxicidade nas concentrações máximas de $0,3\%$. Fato semelhante foi demonstrado anteriormente por esta lectina manose/glicose específica para o também coleóptera *C.maculatus* (dado não publicado). Além disto, Murdock e colaboradores (1990) ao analisar o efeito de 17 lectinas *C.maculatus*, demonstrou que a lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) não provoca alterações no tempo de desenvolvimento da larva e que somente lectinas

com especificidade por N-acetil glicosamina e N-acetil-galactosamina/galactose são dentre todas testadas as únicas a apresentar toxicidade para o gorgulho do feijão. Estes dados sugerem que a atividade inseticida de lectinas para insetos da ordem Coleoptera seja preferencial para lectinas específicas por quitina.

Com o objetivo de comprovar o envolvimento do sítio de ligação à carboidratos, dois experimentos foram realizados. No primeiro, a presença do açúcar manotriose bis N-acetilglucosamil não foi suficiente para inibir os efeitos deletérios da Con Br e da Con A quando administradas ao afídeo em doses correspondentes a LC_{50} . Além disso apresentou um efeito fagoestimulante, levando a um aumento significativo no peso dos insetos. Este complexo biantenário é um potente inibidor da Con A e da Con Br, requerendo as concentrações mínimas de 6 e 13 μM , respectivamente, para inibir a atividade hemaglutinante destas lectinas com hemácias de coelho (DAM *et al.*, 1997). A não-inibição das lectinas pelo complexo biantenário pode ter ocorrido devido ao insucesso da ligação açúcar inibidor-lectina ou, uma outra possibilidade seria que a ligação lectina-açúcar inibidor poderia ter sido deslocada pelos açúcares presentes no trato digestivo dos insetos que estariam em maior quantidade e/ou formassem um complexo mais estável com a lectina. Testes de inibição com açúcares foram realizados anteriormente por Sauvion e colaboradores (dados não publicados) utilizando a Con A e os açúcares D-manose (1 mM) e manana (10 mM), igualmente nenhuma inibição foi observada. Entretanto, sob as mesmas condições, a lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) foi inibida por manana.

No segundo experimento, a Con Br foi submetida à desmetalização com o propósito de inativar os sítios de ligação à carboidratos. Na concentração de 500 $\mu g \cdot mL^{-1}$, a Con Br desmetalizada (Con Br^d) apresentou um efeito letal retardado comparado ao da Con Br controle (Con Br). A Con Br^d foi administrada via dieta artificial desprovida de metais. Esta dieta apresentou um percentual de mortalidade anormal e equivalente ao da Con Br administrada em dieta artificial comum. Esta mortalidade apresentada pela dieta controle sem metais é um forte indício que a mortalidade observada pela Con Br^d não está relacionada à presença da lectina. Um experimento que poderia confirmar a importância do sítio de ligação à carboidratos na atividade inseticida da Con Br poderia ser realizado testando proteínas recombinantes modificadas pela substituição de um ou mais aminoácidos do sítio de

ligação à carboidratos através de mutagênese sítio dirigida (ZHU-SALZMAN *et al.*, 1998).

Na análise eletroforética dos tratos digestivos de adultos de *A.pisum*, alimentados durante o seu período de desenvolvimento com Con Br em diferentes concentrações, observamos que a lectina acumula-se nos tratos digestivos permanecendo intacta. Este resultado sugere que a lectina não sofre degradação proteolítica e possivelmente está ligada ao tecido. Fato semelhante foi observado para Con A em *A.pisum*. Sauvion (1995) ao comparar os resultados obtidos pela eletroforese (em experimento semelhante), pela visualização da Con A-FITC em tratos digestivos através de cortes histológicos e pela análise dos excrementos deste inseto, observou que a Con A não é degradada e acumula-se no estômago do inseto promovendo o crescimento celular do tecido.

A ligação de lectinas tóxicas a proteínas de membrana do trato digestivo de *A.pisum*, foi analisada através de Lectin Blot utilizando lectinas de monocotiledôneas manose específicas e da subtribo Diocleinae manose/glicose específicas. Estas lectinas são capazes de reconhecer proteínas de membrana sendo muito similares dentro de seus grupos, mas diferindo de forma significativa entre eles. As lectinas de monocotiledôneas ligam-se preferencialmente à glicoproteínas de massa molecular acima de 78 kDa enquanto as de Diocleinae ligam-se à glicoproteínas de massas moleculares variadas. Diferenças no reconhecimento são observadas entre a GNA e as outras lectinas de monocotiledôneas, LOA e AMA. Estas últimas não são capazes de reconhecer, ou reconhecem fracamente, uma banda protéica reconhecida pela GNA e pelas lectinas da subtribo Diocleinae. O resultado do experimento sugere que estas lectinas possuem alvos moleculares comuns, o que está de acordo com as diferenças observadas entre Con A e GNA em Lectin blot com proteínas de membrana de tratos digestivos de *Lacanobia oleracea* (FITCHES & GATEHOUSE, 1998). Além disto, sabe-se que as lectinas utilizadas neste ensaio são tóxicas ao inseto (RAHBÉ *et al.*, 1995), logo provavelmente um desses alvos deve ser o receptor da ação tóxica destas lectinas em *A.pisum*.

Após ter concluído que lectinas tóxicas ao *A.pisum* ligam-se à proteínas de membrana do inseto, o passo seguinte foi identificar dentre estas proteínas um possível receptor destas lectinas. O resultado dos experimentos de

cromatografia, separação em PAGE-2D e sequenciamento conduziram a identificação de uma aminopeptidase com massa molecular aparente de 120 kDa e *pi* em torno de 5,0. As aminopeptidases (EC 3.4.11) hidrolisam a porção N-terminal de peptídeos oriundos da ação enzimática de endoproteases encontradas livres no lúmen. Estas enzimas são classificadas de acordo com suas dependências em íons (Zn^{+2} ou Mn^{+2}) e suas especificidades por substratos. Bastante caracterizadas em mamíferos, também têm sido detectadas em insetos das ordens Orthoptera, Isoptera, Hemiptera, Coleoptera, Himenoptera, Diptera e Lepidoptera (TERRA & FERREIRA, 1994). Uma aminopeptidase N, ligada a membrana através de uma âncora GPI (Glicosil-fosfatidilinositol), já foi citada anteriormente como receptor de Cry1Ac, uma proteína de *Bacillus thuringiensis*, em *Manduca sexta* (Lepidoptera) (KNIGHT *et al.*, 1994; SANGADALA *et al.*, 1994; GARCZYNSKI & ADANG, 1995). Entretanto a sua participação como receptor no processo de intoxicação desencadeado pela Cry1Ac é discutida (JENKINS *et al.*, 1999).

Com o objetivo de melhor caracterizar esta aminopeptidase, experimentos em biologia molecular foram realizados para a determinação da seqüência genômica. A construção de uma biblioteca genômica do afídeo a partir do ARN mensageiro, extraído de tratos digestivos do *A.pisum*. Através de oligonucleotídeos degenerados, uma parte da seqüência nucleotídica do cDNA que codifica para esta enzima foi obtida. A seqüência de proteínas derivada confirmou a homologia desta aminopeptidase com as de outros insetos (dado não mostrado). Uma vez determinada a seqüência nucleotídica completa, esta servirá na caracterização estrutural da enzima e seu modo de ligação à membrana. O que posteriormente será necessário para a caracterização das suas interações com toxinas e determinar a resposta do organismo a estas interações, para então poder identificar a função desta glicoproteína no mecanismo de ação das lectinas tóxicas ao *A.pisum*.

A seqüência interna de uma outra proteína com massa molecular aparente de 60 kDa e *pi* na faixa de 5,0 foi analisada através do sequenciamento. Quatro seqüências foram obtidas e, após o alinhamento, indicaram uma homologia com proteínas da membrana externa de bactérias do gênero *Pseudomonas* (OprF). A presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* em *A.pisum* foi identificada anteriormente porém não era conhecida a sua presença nos insetos utilizados no

laboratório. Após a identificação desta proteína, algumas questões foram levantadas. Sabe-se que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* possui uma lectina na sua membrana externa, denominada adesina, responsável esta pelo reconhecimento de glicanos contendo resíduos de manose e derivados. Além disto, a *P.aeruginosa* é capaz de ligar-se "in vivo" e "in vitro" à membranas celulares (KO *et al.*, 1987). De acordo com este dado, pode-se propor dois tipos de respostas acarretadas após a ingestão de Con Br pelo inseto. A primeira seria uma competição entre a bactéria e a lectina pelos sítios de membrana, onde a lectina deslocaria a interação da bactéria com a membrana provocando uma diminuição da população bacteriana. O segundo, a lectina acoplada a membrana poderia ser o elo de ligação da bactéria com o trato digestivo provocando um aumento anormal desta população prejudicando assim o desenvolvimento do inseto. A identificação desta proteína pode parecer a primeira vista um resultado negativo, entretanto estes dados sugerem que a ação tóxica desencadeada pela lectina pode ter diversos mecanismos e não uma única via como se acredita até hoje.

6 – CONCLUSÃO

1. A maioria das lectinas da subtribo Diocleinae analisadas neste trabalho apresenta algum efeito deletério sobre o desenvolvimento do pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae).
2. As lectinas de *Canavalia brasiliensis*, de *C. bonariensis*, de *C. aff. sp. boliviana*, de *Dioclea virgata* e de *D. rostrata* apresentam uma IC_{50} com doses em torno de 100 a 122 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A lectina de *D. rostrata* é a mais letal da subtribo Diocleinae com uma LC_{50} de 67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a lectina de *D. grandiflora* é a única que não apresenta efeito tóxico ao *Acyrtosiphon pisum*.
3. As lectinas de algas *Bryothamnium seafortii* e *B. triquetrum*, de gimnosperma *Ephedra twendianna*, e as de leguminosa *Vatairea macrocarpa* e *Parkia platycephala* não são tóxicas *Acyrtosiphon pisum* quando testadas na dose máxima de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
4. A lectina de *Abrus pulchellus*, uma RIP tipo 2, apresenta uma alta toxicidade ao *A. pisum* com uma LC_{50} de 20,88 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
5. A Con Br e as lectinas de *Cratylia floribunda* e *Dioclea violacea* não apresentaram efeito pro-biótico à ninfas de *A. pisum* nas concentrações consideradas subletais.
6. A Con Br não é letal, na concentração de 0,3 %, para adultos do gorgulho do arroz, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae).
7. No modelo testado, o complexo biantenário manotriose bis N-acetilglucosamil não é capaz de inibir o efeito deletério da Con Br e da Con A durante o

crescimento de ninfas de *A.pisum*. Entretanto, a Con Br desprovida dos íons Ca^{+2} e Mn^{+2} tem o seu efeito letal ao *A.pisum* retardado.

8. A Con Br acumula-se no trato digestivo do *A.pisum*, permanecendo intacta.
9. Lectinas tóxicas ao *A.pisum*, pertencentes as famílias de Monocotiledôneas manose específicas e da subtribo Diocleinae, reconhecem glicoproteínas do trato digestivo do afídeo, apresentando diferenças quantitativas entre os grupos e dentro do grupo das Monocotiledôneas.
10. Várias glicoproteínas do trato digestivo de *A.pisum* foram isoladas através de cromatografia de afinidade em matriz de Agarose com Con Br imobilizada. E uma aminopeptidase de massa molecular aparente de 120 kDa e pI 5,0 foi reconhecida como alvo molecular da Con Br.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 7, n. 1, p. 15 - 19, 1995.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, San Diego, v. 194, n. 1, p. 98 - 102, 1999.

BALZARINI, J.; NEYTS, J.; SCHOLS, D.; HOSOYA, M.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; DE CLERCQ, E. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)_n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 18, p. 191 - 207, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol. Invest.**, v. 21, n. 4, p. 297 - 303, 1992.

BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, p. 1531 - 1540, 1996.

BENTO, C. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, v. 38, n. 1 - 2, p. 48 - 54, 1993.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, J. K. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA, in gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93 - 99, 1987.

BONNOT, G.; FEBVAY, G. AjustNonLin, um logiciél d'ajustment non linéaire sur Mac. **Micro Bulletin**, v. 44, p. 101 - 108, 1992.

BOMFIM, L. R. **Caracterização estrutural de receptores da lectina de sementes de *Parkia platycephala* e a correlação com suas atividades biológicas**. 2001. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BROKAERT, W. F.; NSIMBA-LUBAKY, M.; PEETERS, B.; PEUMANS, W. J. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. **Biochemistry J.**, v. 221, p.163 - 169, 1984.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; DE OLIVEIRA, J. T. A.; GRANGEIRO, T. B. Primary structures and functions of plant lectins. . **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 193 - 201, 1993.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE., J. J. Purification of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* DUKE. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 675 - 680, 1998.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDÁ, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; DA ROCHA, I. M.; GUIMARÃES, F. N.; CAVADA, B. S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1430, p. 367 - 375, 1999.

CHRISPEELS, M. J.; HARTL, P.M.; FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulou-associated precursor of concanavalin A. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 261, n. 22, p.10021 - 10024, 1986.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, v.3, p. 1 - 9, 1991.

CICCHETTI, P.; MAYER, B. J.; THIEL, G.; BALTIMORE, D. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. **Science**, Lancaster, v. 257, p. 803 - 805, 1992.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; EHRLICH, P. **Introduction to insect biology and diversity**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1978.

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; SOUSA, F. A. M.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding site for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 273, n. 20, p. 12082 - 12088, 1988.

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; CECCATO, V. M.; SOUSA, F. A. M.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Thermodynamic binding studies of lectins from *Diocleinae* subtribe to Deoxy Analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 275, n. 21, p. 16119 - 16126, 2000.

DETHIER, V. G. Evolution of receptor sensitivity to secondary plant substances with special reference to deterrents. **Amer. Natur.**, v. 115, p. 67 - 70, 1976.

DIAZ, C. L.; MELCHERS, L. S.; HOOYKAAS, P. J. J.; LUGTENBERG, P. J. J.; KIJNE, J. W. Root specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Nature**, London, v. 338, p. 579 - 581, 1989.

DOWN, R. E.; GATEHOUSE, A. M. R.; HAMILTON, W. D. O.; GATEHOUSE, J. A. Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered *in vitro* and via transgenic

plants both in laboratory and glasshouse trials. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, n. 11 - 12, p. 1035 - 1045, 1996.

DU, J.; FOISSAC, X.; CARSS, A.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Ferritin acts as the most abundant binding protein for snowdrop lectin in the midgut of rice brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, p. 297 - 305, 2000.

EDELMAN, G. M.; WANG, J. L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 253, p. 3016 - 3022, 1978.

EISEMANN, C. H.; DONALSON, R. A.; PEARSON, R. D.; CADOGAN, L. C.; VUOCOLA, T.; TELLAM, R. L. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 1 - 10, 1994.

FAYE, L.; CHRISPEELS, M. J. Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavalin A in jack-bean. **Planta**, Oxford, v. 170, p. 217 - 224, 1987.

FEBVAY, G.; DELOBEL, B.; RAHBÉ, Y. Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera:Aphididae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 66, p. 2449 - 2453, 1988.

FEBVAY, G.; RAHBÉ, Y. 'Toxicologie', un programme pour l'analyse des courbes de mortalité par le méthode des probits sur MacIntosh. **Cah. Techn. INRA**, v. 27, p. 77 - 78, 1991.

FELSTED, R. L.; LEAVITT, R. D.; CHEN, C.; BACHUR, N. R.; DALE, R. M. K. Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 668, p. 132 - 140, 1981.

FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; GOMES, J. C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflamm. Res.**, v. 45, n. 9, p. 442 -447, 1996.

FITCHES, E.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of the tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in the laboratory and glasshouse trials. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, n. 8, p. 727 - 739, 1997.

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

GALBRAITH, W.; GOLDSTEIN, I. J. Phytohemagglutinins: a new class of metalloproteins. Isolation, purification and some properties of the lectin from *Phaseolus lunatus*. **FEBS Letters**, Netherlands, v. 9, p. 197 - 201, 1970.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. DE; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Edit. Agron. Ceres, 1978.

GARCZYNSKI, S. F.; ADANG, M. J. *Bacillus thuringiensis* cryIAc delta-endotoxin binding Aminopeptidase N in the *Manduca sexta* midgut has glycosyl-phosphatidylinositol anchor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, p. 409 - 415, 1995.

GATEHOUSE, A. M. R.; DEWEY, F. M.; DOVE, J.; FENTON, K. A.; PUSZTAI, A. Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of larvae of *Callosobruchus maculatus*: mechanism of toxicity. **Journal of the Science of the Food Agriculture**, v. 35, p. 373 - 380, 1984.

GATEHOUSE, A. M. R.; BARBIERI, L.; STIRPE, I.; CROY, R. R. D. Effects of ribosome inactivating proteins on insect development differences between Lepidoptera and Coleoptera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, p. 43 - 51, 1990.

GUTIERREZ, A. P.; PICKERING, J. Differential impact of the pathogen *Pandora neoaphidis* Humber on the species of *Acrythosiphon* aphids in alfalfa. **The Canadian Entomologist**, v. 123, p. 315 - 320, 1991.

HABIBI, J.; BACKUS, E. A.; CZAPLA, T. H. Subcellular effects and localization of binding sites of phytohemagglutinin in the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). **Cell and Tissue Research**, v. 294, p. 561 - 571, 1998.

HABIBI, J.; BACKUS, E. A.; HUESING, J. E. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, p. 611 - 619, 2000.

HARPER, M. S.; CRENSHAW, R. W.; MULLINS, M. A.; PRIVALLE, L. S. Lectin binding to insect brush border membranes. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 5, p. 1197 - 1202, 1995.

HAUSNER, T. P.; ATMADJA, J.; NIERHAUS, K. H. Evidence that the G2261 region of 23S rRNA is located at the ribosomal binding site of both elongation factors. **Biochimie**, v. 69, p. 911 - 923, 1987.

HERMAN, E. M.; SHANNON, L. M.; CHRISPEELS, M. J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, New York, v. 165, p. 23 - 29, 1985.

HESTER, G.; KAKU, H.; GOLDSTEIN, I. J.; WRIGHT, C. S. Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. **Nature Structural Biology**, v. 2, n. 6, p. 472 - 479, 1995.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, London, v. 330, p. 160 - 163, 1987.

HILL, D. S. **Agricultural Insect Pests of Temperate Regions and Their Control**. Cambridge University Press: England, 1987, 624 p.

HNATOWICH, D. J.; VIRZI, F.; RUSCKOWSKI, M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. **J. Nucl. Med.**, v. 28, n. 8, p. 1294 - 1302, 1987.

HUESING, E. J.; MURDOCK, L. L.; SHADE, E. R. Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 3565 - 3568, 1991a.

HUESING, E. J.; MURDOCK, L. L.; SHADE, E. R. Rice and sting nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 3565 - 3568, 1991b.

HUESING, E. J.; SHADE, E. R.; CHRISPEELS, M. J.; MURDOCK, L. L. Alpha-amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seed to cowpea weevil. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 96, p. 993 - 996, 1991c.

JENZEN, D. H. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black bean on a bruchid beetle. **Science**, Washington, v. 192, p. 795 - 796, 1976.

KAKU, H.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; GOLDSTEIN, I. J. Carbohydrate-binding specificity of the daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) and amaryllis (*Hippeastrum hybr.*) bulb lectins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 279, n. 2, p. 298 - 304, 1990.

KNIGHT, P. J. K.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. The receptor for bacillus thuringiensis CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the

lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Mol. Microbiol.**, v. 11, p. 429 - 436, 1994.

KO, H. L.; BEUTH, J.; SOLTER, H.; UHLENBRUCK, G.; PULVERER, G. *In vitro* na *in vivo* inhibition of lectin mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* by receptor blocking carbohydrates. **Infection**, v. 15, p. 237 - 240, 1987.

KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K.; OSAWA, T. The primary structures of two types of *Ulex europeus* seed lectin. **J. Biochem.**, v. 109, p. 650 - 658, 1991.

KUMAR, M. A.; TIMMS, D. E.; NEET, K. E.; OWEN, W. G.; PEUMANS, W. J.; RAO, A. G. Characterization of the lectin from the bulbs *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. . **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 268, p. 25176 - 25183, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4. **Nature**, London, v. 227, p. 680 - 685, 1970.

MARCUS, S. E.; BURGESS, J.; MAYCOX, P. R.; BOWLES, D. J. A study of maturation events in jackbeans (*Canavalia ensiformis*). **Biochemical Journal**, London, v. 222, p. 265 - 268, 1984.

MERTINS, J. W. Hyperparasitoids from Pea Aphid Mummies, *Acyrtosiphon pisum*, in North America. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, p. 186 - 197, 1985.

MACHUKA, J.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; JACKAI, L. E. N. Effect of plant lectins on larval development of the legume pod borer, *Maruca vitrata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, p. 179 - 187, 1999.

MOREIRA, R. A; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, p. 783 - 787, 1977.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113 - 120, 1984.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; AINOUIZ, I. L. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, s. II, p. 211 - 218, 1991.

MURDOCK, L. L.; HUESING, E. J.; NIELSEN, S. S.; PRATT, R. C.; SHADE, R. E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 85 - 89, 1990.

PEUMANS, W. J.; STINISSEN, H. M.; CARLIER, A. R. Isolation and partial characterization of wheat-germ-agglutinin-like lectins from rye (*Secale cereale*) and barley (*Hordeum vulgare*) embryos. **Biochemical Journal**, London, v. 203, n. 58, p. 239 - 243, 1982.

PEUMANS, W. J.; DE LEY, M.; BROEKAERT, W. F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters**, Netherlands, v. 177, p. 99 - 103, 1984.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, p. 347 - 352, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: specific tools for the identification, isolation, characterization of O-linked glycans. **Crit. Ver. Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, n. 3, p. 209 - 258, 1998.

POWELL, K. S.; GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, V. A.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BOONJAWAT, J.; HORSHAM, K.; GATEHOUSE, J. A. Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 75, n. 1, p. 61 - 65, 1995a.

POWELL, K. S.; GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, V. A.; GATEHOUSE, J. A. Antifeedant effects of plant lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 75, n. 1, p. 51 - 59, 1995b.

PUSZTAI, A. **Plant lectins**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 263 p.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 758 - 760, 1998.

RAHBÉ, Y.; FEBVAY, G.; DELOBEL, B.; BOURNOVILLE, R. *Acyrtosiphon pisum* performance in response to the sugar and amino acid composition of artificial diets, and its relation to Lucerne varietal resistance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 48, n. 3, p. 283 - 292, 1988.

RAHBÉ, Y.; FEBVAY, G. Protein toxicity to aphids: An *in vitro* test on *Acyrtosiphon pisum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 67, n. 2, 149 - 160, 1993.

RAHBÉ, Y.; SAUVION, N.; FEBVAY, G.; PEUMANS, W. J.; GATEHOUSE A. M. R. Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 76, n. 2, 143 - 155, 1995.

RAIKEL, N. V.; LEE, H. I.; BROEKAERT, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annu Ver Plant Physiol plant mol Biol.**, v. 44, p. 591 - 615, 1993.

RAMOS, M. V. Biosynthesis and structural lectin features of the Phaseolae, Dioclainae and Viceae (Leguminosae = Fabaceae) under a phylogenetic perspective. **J. Comp. Biol.**, v. 2, n. 2, p. 129 - 136, 1997.

RAMOS, M. V.; MOTA, D. M.; TEIXEIRA, C. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, p. 1 - 8, 1998.

REEKE, G. N.; BECKER, J. W. Carbohydrate-binding sites of plant lectins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 139, p. 35 - 58, 1988.

RINDERLE, S. J.; GOLDSTEIN, I. J.; MATTA, K. L.; RATCLIFFE, R. M. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 264, n. 27, p. 16123 - 16131, 1989.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J. T.; DE-AZEVEDO-MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, n. 8, p. 823 - 826, 1992.

SAITO, K.; KOMAE, A.; KAKUTA, M.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; GOLDSTEIN, I. J.; MISAKI, A. The alpha-mannosyl-binding lectin from leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*). Application to separation of alpha-D-mannans from alpha-D-glucans. **Eur. J. Biochem.**, v. 217, n. 2, p. 677 - 681, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: A laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Entry of ricin and shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 19, p. 5943 - 5950, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5436 - 5467, 1977.

SANGADALA, S.; WALTERS, F. S.; ENGLISH, L. H.; ADANG, M. J. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal cryIA(c) toxin binding and (Rb⁺-K⁺)-Rb86 efflux in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 269, p. 10088 - 10092, 1994.

SANTOS, C. F. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina de sementes de *Parkia platycephala* Benth.** 1992. 123 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, Netherlands, v. 405, p. 114 - 118, 1997.

SAUVION, N. **Effets et modes d'action de deux lectines a mannose sur le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Harris).** 1995. 333 f. Tese (Doutorado em Análise e Modelização de Sistemas Biológicos) - Institut National des Sciences Appliquées, Lyon.

SAUVION, N.; RAHBÉ, Y.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, p. 285 - 293, 1996.

SÉRVULO, K. L. B. M. **Purificação e estrutura primária de uma lectina de sementes de *Ephedra twendianna* (Gimnosperma).** 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775 - 806, 1998.

SCHULER, T. H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Tibtech**, v. 16, p. 168 - 175, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. London: Chapman and Hall, 1989. 126 p.

SHIBUYA, N.; GOLDSTEIN, I. J.; VAN DAMME E. J.; PEUMANS, W. J. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 263, n. 2, p. 728 - 734, 1988.

SHUKLE, R. H.; MURDOCK, L. L. Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). **Environ. Entomol.**, v. 12, p. 787 - 791, 1983.

SMEETS, K.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J. Comparative study of the post-translational processing of the mannose-binding lectins in the bulbs of garlic (*Allium sativum* L.) and ramsons (*Allium ursinum* L.). **Glycoconjugate Journal**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 309 - 320, 1994.

SRIVASTAVA, P. N.; GAO, Y.; LEVESQUE, J.; AUCLAIR, J. L. Differences in amino acid requirements between two biotypes of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Can. J. Zool.**, v. 63, n. 3, p. 603 - 606, 1985.

TERRA, W.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 109B, n. 1, p. 1 - 62, 1994.

THORSTEINSON, A. J. Host selection in phytophagous insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 5, p. 193 - 218, 1960.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DEBEUCKLEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, London, v. 327, p. 33 - 37, 1987.

VAN DAMME, E. J. M.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop

(*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Letters**, Netherlands, v. 215, n. 1, p.140 - 144, 1987.

VAN DAMME, E. J. M.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Related mannose-specific lectins from different species of the family Amaryllidaceae. **Physiologia Plantarum**, v. 73, p. 52 - 57, 1988.

VAN DAMME, E. J.; KAKU, H.; PERINI, F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEETERS, B.; YAGI, F.; DECOCK, B.; PEUMANS, W. J. Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 1, p. 23 - 30, 1991.

VAN DAMME, E. J. M.; BALZARINI, J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. The monomeric and dimeric mannose-binding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities. **Glycoconjugate Journal**, Dordrecht, v. 11, p. 321 - 332, 1994.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Progress in structural analysis of plant lectins through molecular cloning. In: Van Driessche, E., Rougé, P., Beeckmans, S., Bog-Hansen, T. C. (Eds.). **Lectins: Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Textop, Hellerup, Denmark, v. 11, p. 17 - 27, 1996.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575 - 692, 1998.

ZHOU, X.; LI, X.; YUAN, J.; TANG, Z.; LIU, W. Toxicity of cinnamomin - a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, p. 259 - 264, 2000.

ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; NARASIMHAN, M.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; MURDOCK, L. L. Carbohydrate binding

and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin
II. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 25, p. 15123 - 15128, 1998.

9 - APÊNDICE

TABELA A1. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Con Br administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. Crítica	Valor p*
Controle, Con Br a	0,106	0,099	0,0017
Controle, Con Br b	0,405	0,099	<0,0001
Controle, Con Br c	0,567	0,104	<0,0001
Controle, Con Br d	0,765	0,152	<0,0001
Controle, Con Br e	0,795	0,137	<0,0001
Con Br a, Con Br b	0,299	0,098	<0,0001
Con Br a, Con Br c	0,462	0,102	<0,0001
Con Br a, Con Br d	0,660	0,151	<0,0001
Con Br a, Con Br e	0,689	0,136	<0,0001
Con Br b, Con Br c	0,163	0,103	<0,0001
Con Br b, Con Br d	0,361	0,151	<0,0001
Con Br b, Con Br e	0,391	0,137	<0,0001
Con Br c, Con Br d	0,198	0,155	0,0002
Con Br c, Con Br e	0,228	0,140	<0,0001
Con Br d, Con Br e	0,030	0,179	0,6221

Con Br a ($31\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Con Br b ($63\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Con Br c ($125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Con Br d ($250\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Con Br e ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,033 são considerados significativos.

TABELA A2. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de CFL administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. Crítica	Valor p*
Controle, CFL a	0,087	0,113	0,0187
Controle, CFL b	0,178	0,110	<0,0001
Controle, CFL c	0,518	0,129	<0,0001
Controle, CFL d	0,628	0,117	<0,0001
Controle, CFL e	0,688	0,154	<0,0001
Controle, CFL f	0,849	0,334	<0,0001
CFL a, CFL b	0,090	0,113	0,0149
CFL a, CFL c	0,431	0,131	<0,0001
CFL a, CFL d	0,541	0,119	<0,0001
CFL a, CFL e	0,601	0,156	<0,0001
CFL a, CFL f	0,761	0,335	<0,0001
CFL b, CFL c	0,341	0,129	<0,0001
CFL b, CFL d	0,451	0,117	<0,0001
CFL b, CFL e	0,510	0,154	<0,0001
CFL b, CFL f	0,671	0,334	<0,0001
CFL c, CFL d	0,110	0,134	0,0128
CFL c, CFL e	0,169	0,168	0,0022
CFL c, CFL f	0,330	0,340	0,0032
CFL d, CFL e	0,060	0,158	0,2487
CFL d, CFL f	0,221	0,336	0,0449
CFL e, CFL f	0,161	0,351	0,1600

CFL a ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL b ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL c ($125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL d ($250\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL e ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL f ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0024 são considerados significativos.

TABELA A3. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de DVL administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. Crítica	Valor p*
Controle, DVL a	-0,026	0,113	0,4874
Controle, DVL b	-0,075	0,115	0,0474
Controle, DVL c	0,212	0,116	<0,0001
Controle, DVL d	0,440	0,118	<0,0001
Controle, DVL e	0,581	0,145	<0,0001
Controle, DVL f	0,665	0,196	<0,0001
DVL a, DVL b	-0,049	0,113	0,1827
DVL a, DVL c	0,238	0,113	<0,0001
DVL a, DVL d	0,466	0,115	<0,0001
DVL a, DVL e	0,606	0,143	<0,0001
DVL a, DVL f	0,691	0,195	<0,0001
DVL b, DVL c	0,287	0,116	<0,0001
DVL b, DVL d	0,515	0,118	<0,0001
DVL b, DVL e	0,656	0,145	<0,0001
DVL b, DVL f	0,740	0,196	<0,0001
DVL c, DVL d	0,228	0,118	<0,0001
DVL c, DVL e	0,369	0,146	<0,0001
DVL c, DVL f	0,453	0,196	<0,0001
DVL d, DVL e	0,141	0,147	0,0036
DVL d, DVL f	0,225	0,197	0,0006
DVL e, DVL f	0,084	0,215	0,2307

DVL a ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), DVL b ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), DVL c ($125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), DVL d ($250\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), DVL e ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), DVL f ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0024 são considerados significativos.

TABELA A4. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Con Br administradas em dose subletais através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. Crítica	Valor p*
Controle, Con Br a	-0,023	0,132	0,6229
Controle, Con Br b	-2,863E-3	0,133	0,9515
Controle, Con Br c	-0,029	0,133	0,5364
Controle, Con Br d	0,100	0,137	0,0401
Con Br a, Con Br b	0,02	0,132	0,6653
Con Br a, Con Br c	-6,062E-3	0,132	0,8965
Con Br a, Con Br d	0,123	0,136	0,0110
Con Br b, Con Br c	0,026	0,132	0,5754
Con Br b, Con Br d	0,103	0,137	0,0340
Con Br c, Con Br d	0,129	0,137	0,0079

Con Br a ($2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Con Br b ($5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Con Br c ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Con Br d ($20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,005 são considerados significativos.

TABELA A5. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de CFL administradas em dose subletais através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. Crítica	Valor p*
Controle, CFL a	0,012	0,112	0,7587
Controle, CFL b	-0,026	0,113	0,5198
Controle, CFL c	-0,041	0,116	0,3124
Controle, CFL d	0,083	0,116	0,0441
CFL a, CFL b	-0,038	0,112	0,3388
CFL a, CFL c	-0,053	0,115	0,1878
CFL a, CFL d	0,071	0,115	0,0823
CFL b, CFL c	-0,016	0,116	0,7006
CFL b, CFL d	0,109	0,116	0,0087
CFL c, CFL d	0,125	0,119	0,0035

CFL a ($2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL b ($5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL c ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), CFL d ($20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,005 são considerados significativos.

TABELA A6. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de DVL administradas em dose subletais através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. Crítica	Valor p*
Controle, DVL a	-0,098	0,130	0,0264
Controle, DVL b	0,042	0,130	0,3410
Controle, DVL c	-0,041	0,131	0,3593
Controle, DVL d	0,056	0,132	0,2158
Controle, DVL e	-0,023	0,130	0,6057
DVL a, DVL b	0,140	0,127	0,0012
DVL a, DVL c	0,057	0,127	0,1826
DVL a, DVL d	0,154	0,129	0,0005
DVL a, DVL e	0,075	0,127	0,0797
DVL b, DVL c	-0,082	0,127	0,0564
DVL b, DVL d	0,014	0,129	0,7551
DVL b, DVL e	-0,065	0,127	0,1325
DVL c, DVL d	0,096	0,130	0,0294
DVL c, DVL e	0,018	0,127	0,6791
DVL d, DVL e	-0,078	0,129	0,0743

DVL a ($10\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), DVL b ($50\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), DVL c ($125\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), DVL d ($250\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), DVL e ($500\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0033 são considerados significativos.

TABELA A7. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% , em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de CABO administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Valor p*
Controle, CABO a	0,497	<0,0001
Controle, CABO b	0,758	<0,0001
CABO a, CABO b	0,261	<0,0001

CABO a ($100\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), CABO b ($500\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0001 são considerados significativos.

TABELA A8. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Cbol administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Valor p*
Controle, Cbol a	0,459	<0,0001
Controle, Cbol b	0,725	<0,0001
CBOL a, Cbol b	0,266	<0,0001

Cbol a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Cbol b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0001 são considerados significativos.

TABELA A9. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de CGRA administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Valor p*
Controle, Cgra a	0,327	<0,0001
Controle, Cgra b	0,654	<0,0001
CGRA a, Cgra b	0,327	<0,0001

Cgra a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Cgra b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0001 são considerados significativos.

TABELA A10. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Dros administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, Dros a	0,503	0,109	<0,0001
Controle, Dros b	0,779	0,129	<0,0001
Dros a, Dros b	0,275	0,144	<0,0001

Dros a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Dros b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A11. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Dvir administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, Dvir a	0,501	0,086	<0,0001
Controle, Dvir b	0,816	0,293	<0,0001
Dvir a, Dvir b	0,315	0,295	0,0108

Dvir a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Dvir b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A12. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de Dgui administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, Dgui a	0,138	0,111	0,0031
Controle, Dgui b	0,755	0,321	<0,0001
Dgui a, Dgui b	0,616	0,321	<0,0001

Dgui a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Dgui b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A13. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de DGL administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, DGL a	0,081	0,128	0,1292
Controle, DGL b	0,133	0,138	0,0204
DGL a, DGL b	0,053	0,135	0,3460

DGL a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), DGL b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A14. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de ALF administradas em dose subletais através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. Crítica	Valor p*
Controle, ALF a	0,199	0,102	<0,0001
Controle, ALF b	0,465	0,112	<0,0001
Controle, ALF c	0,684	0,103	<0,0001
ALF a, ALF b*	0,266	0,111	<0,0001
ALF a, ALF c	0,485	0,102	<0,0001
ALF b, ALF c	0,219	0,112	<0,0001

ALF a ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ALF b ($25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ALF c ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0083 são considerados significativos.

TABELA A15. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de BS administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, BS a	0,161	0,075	<0,0001
Controle, BS b	0,167	0,073	<0,0001
BS a, BS b	0,006	0,074	0,8424

BS a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), BS b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A16. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de BT administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, BT a	0,101	0,082	0,0031
Controle, BT b	0,183	0,080	<0,0001
BT a, BT b	0,082	0,082	0,0171

BT a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), BT b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A17. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de PPL administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, PPL a	0,224	0,081	<0,0001
Controle, PPL b	0,023	0,085	0,5103
PPL a, PPL b	-0,201	0,086	<0,0001

PPL a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), PPL b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A18. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de EPH administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, EPH a	0,103	0,080	0,0022
Controle, EPH b	0,445	0,084	<0,0001
EPH a, EPH b	0,342	0,083	<0,0001

EPH a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), EPH b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A19. Teste de Bonferonni/Dunn (5%) para peso médio (% em relação ao controle) de *Acyrtosiphon pisum* em função das diferentes concentrações de VML administradas através de dieta artificial.

Comparação de Dietas	Dif. Média	Dif. crítica	Valor p*
Controle, VML a	0,060	0,122	0,2307
Controle, VML b	0,331	0,123	<0,0001
VML a, VML b	0,271	0,110	<0,0001

VML a ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), VML b ($500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$);

*Valores inferiores a 0,0167 são considerados significativos.

TABELA A20. Lectinas utilizadas e suas características

Espécie	Sigla	Classificação Taxonômica	Especificidade	Estrutura Molecular
<i>Arum maculatum</i>	AMA	Monocotiledônea: Araceae	Man	($\alpha\beta$) ₂
<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	Monocotiledônea: Amaryllidaceae	Man	α_4
<i>Listera ovata</i>	LOA	Monocotiledônea: Orchidaceae	Man	α_2, α
<i>Parkia platycephalla</i>	PPL	Mimosoideae: Parkiea	Man/Glu	α_2, α_4
<i>Abrus pulchellus</i>	APL	Papilionoideae: Abrinae	Gal	$\alpha\beta$
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>C. brasiliensis</i>	Con Br	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>C. bonariensis</i>	Cabo	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>C. sp. aff. boliviana</i>	Cbol	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>C. grandiflora</i>	Cgra	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>Cratylia floribunda</i>	CFL	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>Dioclea grandiflora</i>	DGL	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>D. guianensis</i>	Dgui	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>D. rostrata</i>	Dros	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>D. virgata</i>	Dvir	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>D. violacea</i>	DVL	Papilionoideae: Diocleinae	Man/Glu	α_4, α_2
<i>Vatairea macrocarpa</i>	VML	Papilionoideae: Dalbergieae	Gal	α_4
<i>Bryothamnium seafortii</i>	Bs	Rhodophyta: Rhodomelaceae	fetuína	α_2
<i>B. triquetrum</i>	Bt	Rhodophyta: Rhodomelaceae	fetuína	α_2
<i>Ephedra tweendiana</i>	EPH	Gimnospermae	mucina	n.d.

n.d. não determinada

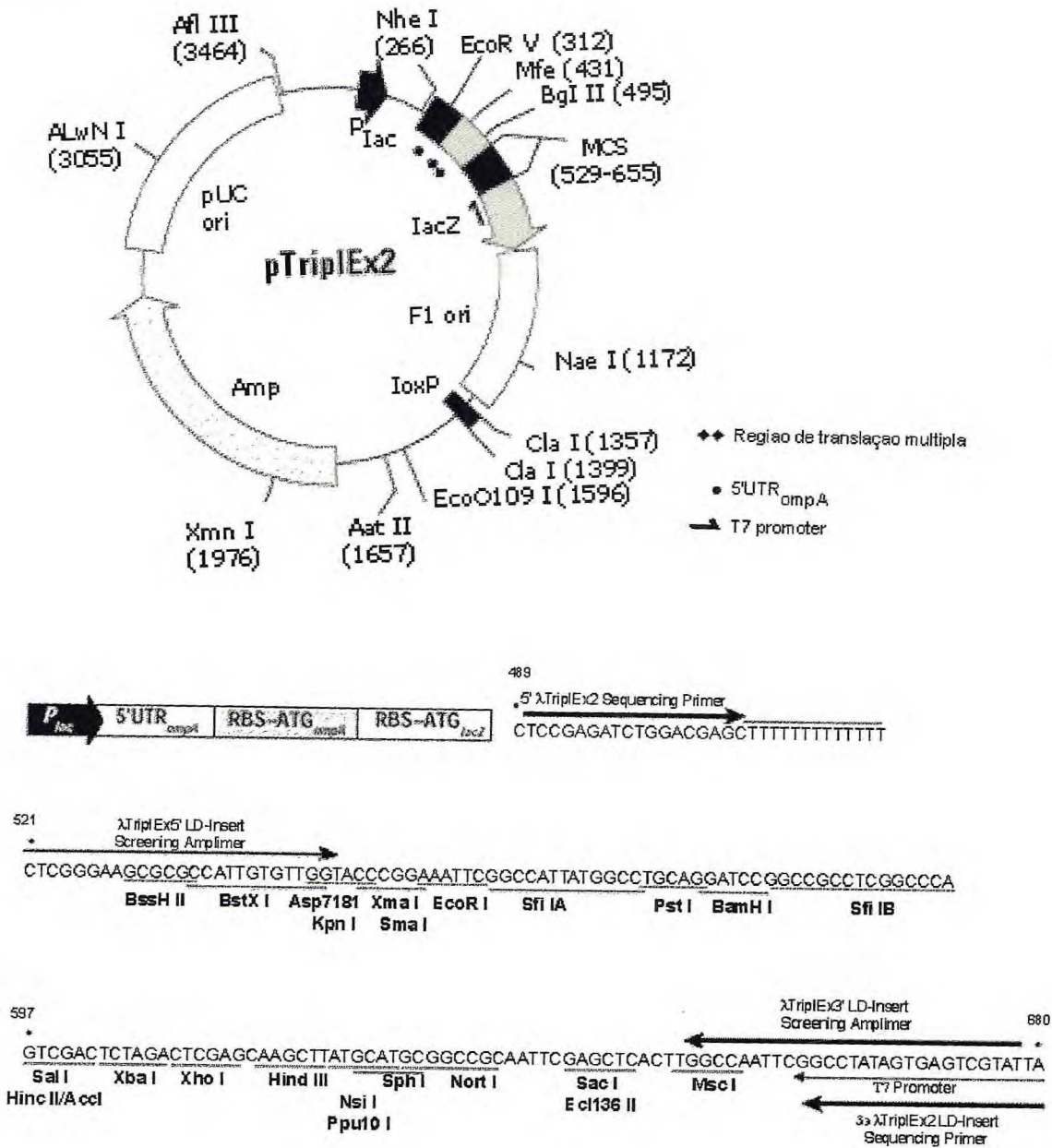


FIGURA A1. Vector pTriplEx2, mapa de restrição e sitio de clonagem múltipla.

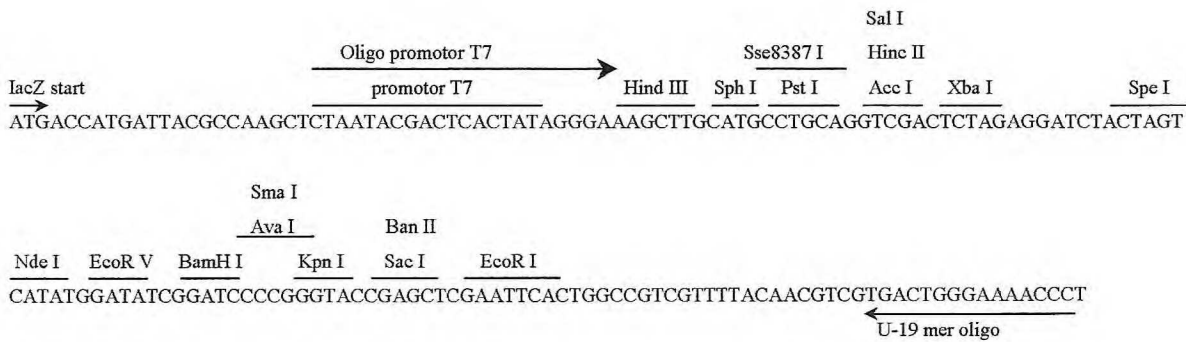
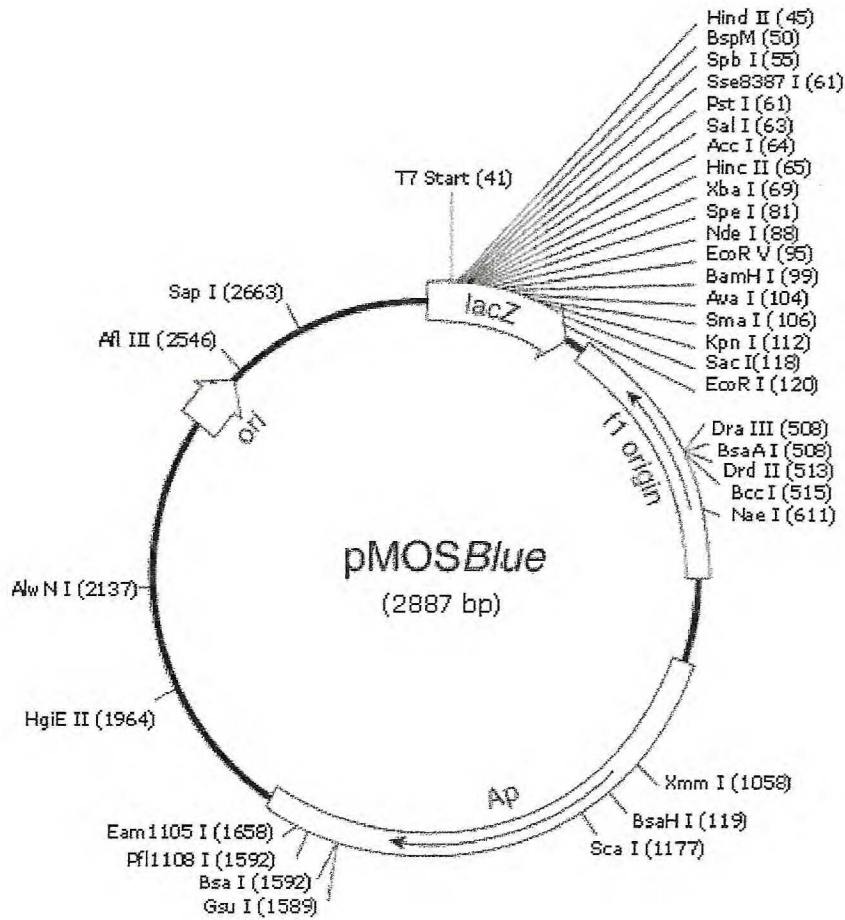


FIGURA A2. Vector de clonagem *pMOSBlue*.

TABELA A21. Genótipo de cepas bacterianas

Cepa	Genótipo
DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1
XL1-Blue	endA1, gyrA96, hsdR17, lac ⁻ , recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lacI q Z DM15, proAB, Tn 10]