



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

BRUNO HENRIQUE MAIA SILVA

**CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E MODELAGEM MOLECULAR POR
HOMOLOGIA DA SEQUÊNCIA PARCIAL DE UMA VICILINA DE GENÓTIPOS
DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] CONTRASTANTES EM
RELAÇÃO À RESISTÊNCIA AO CARUNCHO *Callosobruchus maculatus*.**

**FORTALEZA
2014**

BRUNO HENRIQUE MAIA SILVA

**CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E MODELAGEM MOLECULAR POR
HOMOLOGIA DA SEQUÊNCIA PARCIAL DE UMA VICILINA DE GENÓTIPOS
DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] CONTRASTANTES EM
RELAÇÃO À RESISTÊNCIA AO CARUNCHO *Callosobruchus maculatus*.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa
Grangeiro

**FORTALEZA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S578c Silva, Bruno Henrique Maia.
Clonagem, sequenciamento e modelagem molecular por homologia da sequência parcial de uma vicilina de genótipos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] contrastantes em relação à resistência ao caruncho *Callosobruchus maculatus* / Bruno Henrique Maia Silva. – 2014.
51 f. : il., color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. Feijão-caupi. 2. Química vegetal. 3. Cupina. 4. Quitina. I. Título.

CDD 574-192

BRUNO HENRIQUE MAIA SILVA

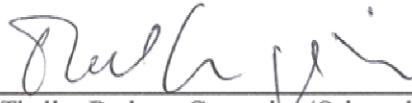
**CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E MODELAGEM MOLECULAR POR
HOMOLOGIA DA SEQUÊNCIA PARCIAL DE UMA VICILINA DE GENÓTIPOS DE
FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] CONTRASTANTES EM
RELAÇÃO À RESISTÊNCIA AO CARUNCHO *Callosobruchus maculatus*.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

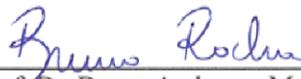
Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará



Dr. Jose Edvar Monteiro Júnior
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais e padrinhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos Alberto da Silva e Maria Edna Maia da Silva, por todo o apoio em todas as minhas decisões e escolha profissional, e por todo o incentivo e investimento em minha educação. Por todos os imensos esforços que fizeram por mim e por todo o amor oferecido, serei sempre grato e sempre os amarei.

Aos meus padrinhos, Francisco Williams Maia e Francisca Olineuza Nogueira Peixoto Maia, por todo apoio e atenção sempre que eu precisei, e por toda a imensa ajuda que me foi prestada. Por todo o incentivo e boa vontade, além do exercício no papel de “pais” para comigo, muito obrigado.

Ao Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela oportunidade em trabalhar no Laboratório de Genética Molecular, por toda a orientação e aprendizado, pelas ajudas oferecidas e puxões de orelha, e mais ainda pela amizade. Serei sempre muito grato.

Ao Professor Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha e ao Dr. José Edvar Monteiro Júnior, pelo aceite do convite. Em especial ao Edvar, agradeço muito por toda a ajuda prestada a mim no laboratório, todo o convívio e aprendizado, e pela amizade desenvolvida ao longo deste período, muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos e irmãos Marcos André, Flávio Henrique, Fabrício Rodrigues e Hélio Job, que apesar de estarem distantes neste momento, sempre me deram apoio. Sou muito grato por toda a consideração e imensa amizade.

Aos meus amigos Takase, Marcel, Larissa, Suelen, Igor, Martônio e Raquel. Pelo convívio ao longo desses meses difíceis.

A todos aqueles que me ajudaram neste trabalho direta ou indiretamente. Muito obrigado a todos!

“Penso, logo existo.”
(René Descartes)

“Jacaré que dorme vira bolsa!”
(Companhia da Lapada)

“Boca livre e pênalti só perde quem é trouxa.”
(Fausto Silva)

**“Não há nada mais valioso que a própria verdade.
Ela nunca desvaloriza ou humilha aquele que a procura.”**
(Al-Kindi)

RESUMO

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa com alto teor de proteínas, muito consumida e cultivada na região Nordeste do Brasil. Devido a sua importância econômica, existem vários estudos que procuram formas de cultivares resistentes desta espécie de feijão, pois esta é muito atacada por diversos tipos de pragas e predadores. Um dos mais comuns é o caruncho *Callosobruchus maculatos*. Com a descoberta de cultivares resistentes a este inseto, questionou-se sobre o componente biológico da planta responsável por tal ação defensiva. Alguns estudos sugerem que essa resistência ocorre devido as vicilinas, que são proteínas de reserva nutritiva, presentes nas sementes do feijão-de-corda. No presente trabalho, foram sequenciadas regiões pertencentes ao gene de vicilina de dois cultivares contrastantes em relação ao ataque do caruncho, sendo um resistente (IT81D-1053) e outro suscetível (EPACE-10). Essas sequências, advindas de vários clones, foram analisadas e com isso foi feita a dedução de sua estrutura tridimensional através de uma modelagem por homologia, utilizando como molde uma globulina 7S de feijão-azuki (*Vigna angularis*) identificada como 2EA7 no banco de dados PDB. A análise das sequências revelou que há duas regiões bastante variáveis na sequência do gene da vicilina, sendo essas regiões ricas em glutamina. Estudos anteriores sugerem que a resistência ao gorgulho se dá no fato de que as vicilinas conseguem se ligar a quitina, e tais regiões são potencialmente ligantes a quitina devido a grande capacidade de formar ligações de hidrogênio entre os resíduos de glutamina e os resíduos de N-acetilglucosamina. A análise estrutural também corrobora esta hipótese, pois a região rica em glutamina é bastante exposta, em relação à superfície proteica, o que facilita a interação destes resíduos de aminoácidos interagirem com a quitina. Entretanto estudos mais refinados são necessários para se ter uma maior certeza de como se dá esta interação entre vicilinas e a quitina, e se de fato essas proteínas são mesmo fundamentais na resistência contra o caruncho.

Palavras-chave: Caupi; Cupina; Quitina; Modelagem.

ABSTRACT

The cowpea bean [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is a legume with high protein levels, largely cultivated and consumed in the Northeast of Brazil. Due to your economic importance, there are several studies that search resistant forms of cultivars of this kind of bean, as they is often attacked by different kinds of pests and predators. One of the most common is the weevil *Callosobruchus maculatos*. With the discovery of resistant cultivars for this insect many questions emerged about what biological component of the plant was responsible for such defensive action. Some studies suggest that this resistance is due to vicilin, which are reserve nutritious proteins, present in the seeds of cowpea. In this work, regions belonging to the vicilin gene of two contrasting cultivars in relation to resistance to weevil were sequenced, one resistant (IT81D-1053) and a susceptible (EPACE-10). These sequences, which come from several clones, were analyzed and thereby deducting its three-dimensional structure was made through a homology modeling using as template one 7S globulin from adzuki bean (*Vigna angularis*) identified as 2EA7 in the PDB database. Sequence analysis revealed that there are two regions highly variable in sequence from the vicilin gene, and these regions are rich in glutamine. Previous studies suggest that resistance to weevil occurs in the fact that the vicilin can bind to chitin and such glutamine rich regions are potentially chitin binding due to the high ability to form hydrogen bonds between the residues of glutamine and residues of N-acetylglucosamine. The structural analysis also supports this assumption, because the region rich in glutamine is very exposed, in relation to the protein surface, which facilitates the interaction of these amino acid residues with chitin. However more refined studies are needed to have a certainty of how is this interaction between vicilin and chitin, and if these same proteins are in fact fundamental in the resistance against the weevil.

Key words: Cowpea; Cupin; Chitin; Modeling.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Flor de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). A quilha formada pelas pétalas envolve o estigma e as anteras. Foto de Gilberto Palma. **Pág. 16**
- Figura 2** Espécime adulto do caruncho do caupi, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). Foto de D. G. Kasatkin. **Pág. 18**
- Figura 3** Alinhamento das sequências utilizadas para a construção dos oligonucleotídeos iniciadores. Na sequência da vicilina de *Vigna unguiculata* as regiões sombreadas em cinza são os éxons ímpares (1º, 3º e 5º éxon), e as regiões sublinhadas são os éxons pares (2º, 4º e 6º éxon). As regiões sombreadas em vermelho é onde os iniciadores se anelam. As regiões com grande variabilidade de glutaminas está destacada em amarelo. **Pág. 26**
- Figura 4** Produtos da PCR com iniciadores específicos de vicilina e produtos da reação de ligação com pGEM-T Easy; E = produto do DNA genômico do genótipo EPACE-10. I = produto do DNA genômico de IT81D-1053. LE = plasmídeo ligado ao produto do EPACE-10. LI = plasmídeo ligado ao produto do IT81D-1053. C- = controle negativo. M = marcador molecular Ladder 1Kb. **Pág. 34**
- Figura 5** Reação de digestão dos plasmídeos extraídos dos clones resistentes e suscetíveis com a enzima EcoRI. Apenas os clones S4, S5, S6, S8, S10, R1, R3, R5, R7, R10, R11, R15 e R16 apresentaram o inserto ligado ao pGEM-T Easy. C- = controle negativo. M = marcador molecular Ladder 1Kb. **Pág. 36**
- Figura 6** Alinhamento das sequências de proteína de cada clone. As diferenças entre as sequências estão destacadas em amarelo. **Pág. 38**
- Figura 7** Gráfico de Ramachandran do modelo M6 feito na ferramenta MolProbity. **Pág. 42**
- Figura 8** Gráfico de Ramachandran do modelo M8 feito na ferramenta MolProbity. **Pág. 43**
- Figura 9** Gráfico de Ramachandran do modelo M9 feito na ferramenta MolProbity. **Pág. 44**
- Figura 10** Modelo (M6) da estrutura tridimensional da vicilina de *Vigna unguiculata*. As regiões destacadas em vermelho são aquelas ricas em glutaminas. Os grupos-R dos resíduos dessas regiões também estão destacados. **Pág. 45**
- Figura 11** Disposição da estrutura trimérica do modelo M6, com as regiões ricas em glutamina destacadas em vermelho. **Pág. 45**
- Figura 12** Modelo (M8) da estrutura tridimensional da vicilina de *Vigna unguiculata*. As regiões destacadas em vermelho são aquelas ricas em glutaminas. Os grupos-R dos resíduos dessas regiões também estão destacados. **Pág. 46**
- Figura 13** Disposição da estrutura trimérica do modelo M8, com as regiões ricas em glutamina destacadas em vermelho. **Pág. 46**
- Figura 14** Modelo (M9) da estrutura tridimensional da vicilina de *Vigna unguiculata*. As regiões destacadas em vermelho são aquelas ricas em glutaminas. Os grupos-R dos resíduos dessas regiões também estão destacados. **Pág. 47**

Figura 15 Disposição da estrutura trimérica do modelo M9, com as regiões ricas em glutamina destacadas em vermelho. **Pág. 47**

Figura 16 Esquema sugerido por Maruyama et al. (2004) de como se dá a ligação de resíduos de aminoácidos à resíduos de N-acetilglucosamina através de ligações de hidrogênio. **Pág. 49**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região codificadora do gene da vicilina de *Vigna unguiculata*. **Pág. 25**
- Tabela 2.** Respective clones de cada modelo. De acordo com as diferenças entre as sequências de cada clone, estas foram agrupadas para a posterior elaboração do modelo estrutural. **Pág. 41**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
PDB	Banco de dados de proteína
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
Vic1	Iniciador “senso” de vicilina de <i>Vigna unguiculata</i>
Vic2	Iniciador “reverso” de vicilina de <i>Vigna unguiculata</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O feijão-de-corda.....	15
1.2 <i>Callosobruchus maculatus</i>	17
1.3 Vicilinas.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS.....	23
3.1 Sementes.....	23
3.2 Bactérias.....	23
3.3 Enzimas.....	23
3.4 Plasmídeos.....	24
3.5 Reagentes e outros materiais.....	24
4. MÉTODOS.....	25
4.1 Preparação do material vegetal.....	25
4.2 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	25
4.3 Extração de DNA total.....	28
4.4 PCR.....	29
4.5 Eletroforese em gel de agarose.....	29
4.6 Clonagem da sequência codificadora da vicilina.....	30
4.7 Extração de plasmídeo.....	30
4.8 Sequenciamento de DNA.....	31
4.9 Modelagem por homologia.....	32
5.RESULTADOS.....	33
5.1 Extração de DNA total, PCR e reação de ligação.....	33
5.2 Clonagem e sequenciamento.....	35
5.3 Análise e avaliação dos modelos estruturais.....	37
6. DISCUSSÃO.....	48
7.CONCLUSÃO.....	50
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 O feijão-de-corda

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] (fig. 1) é uma dicotiledônia pertencente à família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae e ao gênero *Vigna*, sendo diplóide com $2n=22$ cromossomos, os quais são pequenos e de difícil manipulação (FREIRE-FILHO, 1988).

Trata-se de uma espécie originária do oeste da África, sendo cultivada nas principais regiões tropicais em todo o mundo. O maior centro de diversidade de cultivares também é o oeste da África, ficando a Índia em segundo lugar (MURDOCK et al., 2003). Já a maior diversidade de genótipos selvagens ocorre, principalmente, na região sudeste da África (TAIWO, 1998).

No Brasil existe uma grande diversidade de cultivares de *V. unguiculata* que, além da denominação popular feijão-de-corda, também é conhecido como feijão caupi, feijão macassar, feijão-de-vagem, feijão-de-vara, feijão-de-moita (na região Nordeste), feijão-da-praia, feijão-de-praia (região Norte), feijão catador (Bahia), feijão gurutuba (Bahia e norte de Minas Gerais), feijão trepa-pau (Maranhão), feijão fradinho (Rio de Janeiro) ou feijão miúdo (região Sul) (BARRETO, 1999).

Devido ao seu alto valor nutritivo, o feijão-de-corda é cultivado visando, principalmente, a produção de grãos secos ou verdes para o consumo humano. Porém, a planta também pode ser utilizada como forragem verde, feno, ensilagem farinha para alimentação animal, adubação verde e proteção do solo (DE OLIVEIRA et al., 2009).

No Brasil, o cultivo do feijão-de-corda é feito principalmente no sertão semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas da Amazônia (DE FREITAS FERNANDES et al., 2010), e sua produção encontra muitos entraves como pragas, doenças causadas por vírus, fungos, nematóides e bactérias, má distribuição pluviométrica, baixa fertilidade do solo, entre outros (HILAL et al., 1998).

O desenvolvimento de cultivares produtivos com maturação prematura e resistentes à doenças críticas, pragas e estresses ambientais têm sido uma das maiores metas dos pesquisadores da cultura de feijão-de-corda ao longo dos anos. Tais cultivares prematuros têm a capacidade de escapar das secas de fim de estação, bastante comuns em regiões semi-áridas, além de escaparem de algumas pragas que só se desenvolvem em determinadas épocas do ano, com isso tem-se uma maior produtividade (DIOUF, 2011; FAN et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2011).

Entretanto, os danos causados por insetos ainda são o fator principal que afeta as produções de feijão-de-corda (LIMA et al., 2005). Várias estratégias têm sido usadas para impedir o desenvolvimento desses predadores, como o controle biológico, utilização de cultivares resistentes, e a utilização de inseticidas. Dentre as estratégias citadas, a utilização de cultivares resistentes aos insetos é o método mais viável economicamente. Trata-se de uma abordagem adequada para os países com poucos recursos e para pequenos fazendeiros da África e região Nordeste do Brasil (DAPAAH et al., 2003; LIMA et al., 2005).



Figura 1: Detalhe da flor de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). A quilha formada pelas pétalas envolve o estigma e as anteras. Foto de Gilberto Palma.

1.2 *Callosobruchus maculatus*

Dentre os insetos que atacam *V. unguiculata*, a espécie *Callosobruchus maculatus* Fabrícus, 1775 se constitui uma das mais importantes pragas, atacando as sementes durante a estocagem (CREDLAND, 1986). É uma espécie com a seguinte classificação taxonômica: Classe Hexapoda, Ordem Coleoptera, Subordem Polyphaga, Superfamília Chrysomeloidea, Família Chrysomelidae, Gênero *Callosobruchus* e Espécie *Callosobruchus maculatus*.

O ataque do inseto inicia-se no campo, durante um curto período de armazenamento. O produto destinado à alimentação pode ter o seu valor comercial reduzido em até 50%, enquanto as sementes destinadas ao plantio apresentam uma grande redução do seu poder germinativo (OLIVEIRA, 1971).

Também conhecido como caruncho, ou gorgulho, *C. maculatus* possui desenvolvimento holometabólico descrito por Bastos (1968), passando pelas fases ovo, larva, pupa e adulto. O ovo apresenta coloração branca, forma subelítica, com um dos polos arredondados, e o outro afilado. Possuem um comprimento de cerca de 0,5 mm e altura de 0,3 mm. A larva do caruncho possui cor branca, forma curva e cabeça marrom, chegando a um comprimento médio de 3,0 mm quando completamente desenvolvida. A pupa também é de coloração branca, possuindo vestígios de asas, patas e olhos. No final do seu desenvolvimento adquire uma coloração marrom e um comprimento de 4,0 mm. O inseto adulto tem de 2,5 a 3,0 mm, cabeça preta, desordenadamente pontuada, antenas com onze segmentos, ligeiramente serreada do 5º ao 10º segmento. Apresenta o tórax preto, irregularmente punctuado e com pubescência douradas. A parte posterior do pronoto apresenta duas manchas formadas de pubescência de mesma cor. Os élitros são de coloração marrom e apresentam três manchas pretas (fig. 2). O ciclo de vida (de ovo a adulto) do inseto dura cerca de 22 dias sob temperatura de 32,5 °C e umidade relativa de 70% (FOX, 1993).

O ataque de *C. maculatus* ao feijão-de-corda se inicia quando as fêmeas depositam seus ovos nas sementes estocadas, podendo vencer barreiras como sacos de tecido ou de plástico. Os ovos dos quais as larvas já eclodiram apresentam uma coloração esbranquiçada transparente das partes consumidas pelas larvas durante a eclosão e a penetração na semente. As larvas, então, se desenvolvem, e formam as pupas, das quais

emergem os insetos adultos. Cerca de duas horas após o acasalamento, as fêmeas começam a ovopositar em novas sementes (CREDLAND, 1986).



Figura 2: Espécime adulto do caruncho do caupi, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). Foto de D. G. Kasatkin.

1.3 Vicilinas

A superfamília das cupinas é provavelmente o grupo de proteínas com a maior diversidade de funções bioquímicas que se conhece até hoje. As funções exibidas pelas cupinas variam de atividades isomerásicas e epimerásicas envolvidas na modificação de carboidratos em parede celular de bactérias, a proteínas não-enzimáticas de armazenamento em sementes de plantas, além de fatores de transcrição ligados a calvíce congênita em mamíferos (DUNWELL et al., 2001).

A denominação de cupina vem da forma característica de seu domínio, uma estrutura em barril- β , sendo “cupa” o termo em Latim para barril pequeno. O domínio cupina é caracterizado por dois motivos conservados, cada um correspondendo a duas folhas β , separadas por uma região menos conservada composta por outras duas folhas β , com uma volta (*loop*) de tamanho variável entre elas. A sequência conservada para o Motivo 1 é designada como $G(X)_5HXH(X)_{3,4}E(X)_6G$, e $G(X)_5PXG(X)_2H(X)_3N$ para o Motivo 2 (DUNWELL et al., 2004; KHURI et al., 2001; SHUTOV e KAKHOVSKAYA, 2011).

A identificação de uma superfamília (cupina) foi originariamente baseada na percepção da proteína do trigo, a germina, uma proteína termoestável incomum produzida durante a fase inicial de germinação em embriões de trigo, compartilha uma sequência de nove aminoácidos com uma proteína relativa ao estresse, a esferulina, produzida durante o período de fome do bolor limoso *Physarum polycephalum* (DUNWELL et al., 2001).

As sementes de leguminosas contêm muitas proteínas pertencentes a superfamília das cupinas. Presume-se que devido a termotolerância da estrutura terciária das cupinas, as plantas tenham optado por tais proteínas como meios de armazenamento de aminoácidos, primeiramente em esporos dessecados e depois em sementes, após a evolução das angiospermas (SHUTOV e KAKHOVSKAYA, 2011). Essas proteínas são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente e são acumuladas em corpos proteicos cotiledonários. Elas, chamadas de proteínas de reserva, são de natureza globulínica e classicamente são conhecidas como globulinas 7S e 11S de acordo com seus coeficientes de sedimentação (FREITAS et al., 2004).

As globulinas 7S são conhecidas como vicilinas, e as 11S como leguminas. Vicilinas são proteínas oligoméricas com massa em torno de 150 kDa e suas sub-unidades também podem ser glicosiladas. Leguminas também são oligoméricas, mas geralmente não são glicosiladas. Ambas vicilinas e leguminas são proteínas altamente heterogêneas, no sentido de que os polipeptídeos de suas sub-unidades são codificados por famílias multigênicas. Esta heterogeneidade ainda é aumentada pela glicosilação de suas sub-unidades (DURANTI e GIUS, 1997; ORRUÑO e MORGAN, 2007; SHEWRY, 1995).

Além de terem um papel fundamental no armazenamento de nutrientes, as vicilinas também parecem exercer uma função de defesa em relação ao ataque de predadores na semente. Há alguns anos, no International Institute of Tropical Agriculture (IITA), na Nigéria, um extenso trabalho de busca por cultivares de feijão-de-corda resistentes ao caruncho foi desenvolvido. Apenas um cultivar selvagem de *V. unguiculata*, denominado TVu 2027, apresentou resistência significativa ao *C. maculatos* (GATEHOUSE et al., 1979). Cajazeiras (2000) realizou uma extensa pesquisa de cultivares de feijão-de-corda resistentes ao caruncho.

A resistência desse cultivar de feijão-de-corda ao caruncho, na época, foi atribuída a grande concentração de inibidores de tripsina e/ou a-amilase (GATEHOUSE, 1979). Porém, essa hipótese foi descartada posteriormente quando Baker (1989) e Zhu (1994) não encontraram relação entre esses inibidores e os parâmetros biológicos de resistência ao caruncho.

Uma hipótese proposta por Xavier-Filho (1991) para explicar a resistência natural de cultivares resistentes derivados de TVu 2027 ao *C. maculatos* foi a possível presença de uma variante de proteína vicilina capaz de se ligar a quitina. Quando quatro frações dos componentes das sementes (globulinas, albuminas, um dialisado e o resíduo insolúvel) do cultivar resistente e de um cultivar suscetível ao caruncho foram testadas, observou-se que os efeitos deletérios sobre o inseto estavam associados à fração globulinas. Posteriormente, ao se isolar os componentes da fração globulínica, constatou-se que as vicilinas das sementes resistentes apresentavam efeitos deletérios sobre o caruncho (MACEDO et al., 1993). Além disso, essas vicilinas apresentavam capacidade de se ligar à quitina *in vitro*, e à membrana peritrófica do trato digestivo de *C. maculatus*.

Entretanto, não foram feitos estudos a nível genético/molecular comparando as vicilinas de genótipos resistentes com genótipos suscetíveis. As diferenças existentes no genoma, e, conseqüentemente, na proteína, principalmente a nível estrutural, poderia evidenciar melhor como se daria esse tipo de resistência ao caruncho, e mais especificamente, como a proteína poderia estar interagindo com a quitina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar a clonagem e o sequenciamento de uma região do gene de uma vicilina de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Além disso, objetivou-se também a determinação da estrutura tridimensional da proteína através de modelagem por homologia, de modo a contribuir para o entendimento do mecanismo de defesa contra o caruncho.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar uma região específica da sequência codificadora de uma vicilina pertencentes a dois genótipos contrastantes quanto a infestação pelo caruncho *Callosobruchus maculatos*: IT81D-1053 (resistente) e EPACE-10 (suscetível) (CAJAZEIRAS, 2000).
- Deduzir as sequências completas dos clones obtidos e avaliar as mutações entre eles.
- Gerar modelos das estruturas tridimensionais a partir das sequências de aminoácidos deduzidas dos clones obtidos, por meio da técnica de modelagem por homologia, e analisar os modelos, observando as regiões potencialmente ligantes à quitina.

3. MATERIAIS

3.1 Sementes

As sementes pertencentes aos dois genótipos utilizados nesse trabalho foram gentilmente cedidas pelo Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho, pesquisador do Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte/CPAMN (Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI).

3.2 Bactérias

Escherichia coli TOP 10 F' foram usadas nos experimentos de clonagem do gene da vicilina do feijão-de-corda para o posterior sequenciamento.

3.3 Enzimas

A enzima de restrição *EcoRI* (50 U/ μ L) e seus tampões de reação foram obtidos pela Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). A T4 DNA Ligase (3 U/ μ L) e a *GoTaq* DNA polimerase (5 U/ μ L) foram obtidas da Promega (Madison, WI, USA), cada uma acompanhadas de seus respectivos tampões de reação.

3.4 Plasmídeos

O vetor pGEM-T Easy (Promega) foi utilizado como vetor de clonagem.

3.5 Reagentes e outros materiais

Os oligonucleotídeos iniciadores complementares ao gene da vicilina de *Vigna unguiculata* foram sintetizados pela Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha). Os meios de cultura LB (Lennox L AGAR e Lennox L BROTH BASE) foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies. Todos os demais reagentes usados na realização dos experimentos descritos nesse trabalho foram de grau analítico.

4. MÉTODOS

4.1 Preparação do material vegetal

As sementes de *Vigna unguiculata*, genótipos IT81D-1053 e EPACE-10, foram plantados em vasos com 30 cm de diâmetro contendo areia previamente lavada e autoclavada, Todos os espécimes foram tratados com solução nutritiva ao longo do seu desenvolvimento. 20 dias após a germinação das plantas, folhas foram coletadas para extração de DNA total.

4.2 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

Iniciadores específicos para o gene da vicilina do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) foram desenhados com base na sequência depositada no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) com o seguinte acesso: AM905848, sendo tal sequência referente a um gene de vicilina de *Vigna unguiculata*. As outras sequências: ABG02260, ABG02261, ABG02262, ABW23573, ABW23574 (*Vigna radiata*); BAF56570, BAF56571, BAF56572 (*Vigna angularis*); AAZ06660, AAZ06661, ABU40846 (*Vigna luteola*), também foram usadas para a determinação dos oligonucleotídeos. Os iniciadores foram desenhados objetivando a clonagem de uma região específica do gene da vicilina onde foi verificada uma grande variação (entre as espécies previamente comparadas) na quantidade de glutaminas (fig. 3). O iniciador “senso” foi chamado de Vic1, e o iniciador “reverso” foi chamado de Vic2 (tab. 1).

Iniciador	Sequência (5' → 3')	T _m
Vic1	CCGTACCCGTTAACAACCCT	T _m = 59.68 °C
Vic2	ATAGGTCAACGGTAGTGGCG	T _m = 60.46 °C

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região codificadora do gene da vicilina de *Vigna unguiculata*.

ABW23573_V._radiata	ELIKHAKSSSRKELSSQDEPFNLRNSNPIYSNKFGRWYEITPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	295
ABG02262_V._radiata	ELIKHAKSSSRKELSSQDEPFNLRNSNPIYSNKFGRWYEITPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	295
ABG02261_V._radiata	ELTKHAKSSSKSLSSQDEPFNLRNQKPIYSNKFGEFYEITPKKNPQLKDLDFVFISSVDM	298
ABG02260_V._radiata	ELTKHAKSSSKSLSSQDEPFNLRNQKPIYSNKLGRWFEITPEKNPQLRDLDMFIRSVDM	298
ABW23574_V._radiata	ELTKHAKSSSKSLSSQDEPFNLRNQKPIYSNKLGRWFEITPEKNPQLRDLDMFIRSVDM	298
AAZ06660_V._luteola	ELMRHAKSSSRKTLSSQDEPFNLRNQKPIYSNKFGRWYEITPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	291
BAF56572_V._angularis	ELMKHAKSSSRKELSSQDEPFNLRNSKPIYSNKFGRWYEMTPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	272
BAF56571_V._angularis	ELMKHAKSSSRKELSSQDEPFNLRNSKPIYSNKFGRWYEMTPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	273
BAF56570_V._angularis	ELMKHAKSSSRKELSSQDEPFNLRNSKPIYSNKFGRWYEMTPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	273
ABU40846_V._luteola	ELMRHAKSSSRKTLSSQDEPFNLRNQKPIYSNKFGRWYEITPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	291
AAZ06661_V._luteola	ELMRHAKSSSRKTLSSQDEPFNLRNQKPIYSNKFGRWYEITPEKNPQLKDLDFVFISSVDM	291
Vigna_unguiculata	<u>ELMKHAKSTSKSLSTQNEPFNLRNSQKPIYSNKFGRWYEITPEKNPQLRDLDFVFISSVDM</u>	291
	** :****:* * *:::*****.:*****.* .*:****:*****:****:* **:	
ABW23573_V._radiata	KEGGLLLPHYNSKAIIVILVINEGEAKIELVGPSSDQQQ---QDESLEVQRYRAELSEDDV	351
ABG02262_V._radiata	KEGGLLLPHYNSKAIIVILVINEGEAKIELVGPSSDQQQ---QDESLEVQRYRAELSEDDV	351
ABG02261_V._radiata	KEGSLLLPHYNSKAIIVILVINEGEANIELVGLREEQQQQ--QDERLEVQRYRAEVSDDV	357
ABG02260_V._radiata	KEGSLLLPHYNSKAIIVILVINEGKANIIELVGQREQQKQEEQEEQESWEVQRYRAELSEDDV	358
ABW23574_V._radiata	KEGSLLLPHYNSKAIIVILVINEGKANIIELVGQREQQKQEEQEEQESWEVQRYRAELSEDDV	358
AAZ06660_V._luteola	KEGSLLMPHYNSKAIIVIMVINEGEANIELVGPQREQQQQ--QEEESWQVQRYAAELSEDDV	349
BAF56572_V._angularis	KEGALLLPHYNSKAIIVIMVINEGEAKIELVGLSDQQQQ--KQEEESLEVQRYRAELSEDDV	331
BAF56571_V._angularis	KEGALLLPHYNSKAIIVIMVINEGEAKIELVGLSDQQQQ--KQEEESLEVQRYRAELSEDDV	332
BAF56570_V._angularis	KEGALLLPHYSSKAIIVIMVINEGEAKIELVGLSDQQQQ--KQEEESLEVQRYRAELSEDDV	332
ABU40846_V._luteola	KEGSLLMPHYNSKAIIVIMVINEGEANIELVGPQREQQQQ--QEEESWQVQRYAAELSEDDV	349
AAZ06661_V._luteola	KEGSLLMPHYNSKAIIVIMVINEGEANIELVGPQREQQQQ--QEEESWQVQRYAAELSEDDV	349
Vigna_unguiculata	<u>KEGGLLMPNYNSKAIIVILVNVKGEANIELVGPQREQQQQ--QEEESWEVQRYRAEVSDDDDV</u>	349
	.*:*.*.**:	
ABW23573_V._radiata	FVIPAAYPVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGEKDNMSEIPTEVLDVTFPASGK	411
ABG02262_V._radiata	FVIPAAYPVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGEKDNMSEIPTEVLDVTFPASGK	411
ABG02261_V._radiata	FVIPAAYPVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGEKDNVISEIPTEVLDLAFAPGK	417
ABG02260_V._radiata	FVIPATYVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGEKDNVISEIPTEVLDVTFPASGK	418
ABW23574_V._radiata	FVIPATYVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGEKDNVISEIPTEVLDVTFPASGK	418
AAZ06660_V._luteola	FVIPAAYPVAINATSNLNFVFGINGENNRNQLAGEKDNMSEIPTEVLDVTFPASGK	409
BAF56572_V._angularis	FVIPAAYPVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGGKDNMSEIPTEVLEVTFPASGK	391
BAF56571_V._angularis	FVIPAAYPVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGGKDNMSEIPTEVLEVTFPASGK	392
BAF56570_V._angularis	FVIPAAYPVAINATSNLNFFAFGINAENNRNQLAGGKDNMSEIPTEVLEVTFPASGK	392
ABU40846_V._luteola	FVIPAAYPVAINATSNLNFVFGINGENNRNQLAGEKDNMSEIPTEVLDVTFPASGK	409
AAZ06661_V._luteola	FVIPAAYPVAINATSNLNFVFGINGENNRNQLAGEKDNMSEIPTEVLDVTFPASGK	409
Vigna_unguiculata	<u>FVIPASYPVAITATSNLNFIAFGINAENNRNQLAGEEDNMSEIPTEVLDVTFPASGK</u>	409
	*:	
ABW23573_V._radiata	VEKLIKKQSESHFVDAQPEQQQREEGHKGRKGSLSLILGSLY	453
ABG02262_V._radiata	VEKLIKKQSESHFVDAQPEQQQREEGHKGRKGSLSLILGSLY	453
ABG02261_V._radiata	VEKLVQKQSTSHFVDAQPEQQQREEGPKGRKGFVY-----	453
ABG02260_V._radiata	VKKLIKKQSESQFVDAQPEQQQREEREARKGGKGFVY-----	454
ABW23574_V._radiata	VKKLIKKQSESQFVDAQPEQQQREEREARKGGKGFVY-----	454
AAZ06660_V._luteola	VEKLIQKQTQSHFVDAQPDEQEKGRFVY-----	437
BAF56572_V._angularis	VEKLIKKQSESHFVDAQPEQQQREEGHKGRKGSLSLILGSLY	433
BAF56571_V._angularis	VEKLIKKQSESHFVDAQPEQQQREEGHKGRKGSLSLILGSLY	434
BAF56570_V._angularis	VEKLIKKQSESHFVDAQPEQQQREEGHKGRKGSLSLILGSLY	434
ABU40846_V._luteola	VEKLIQKQTQSHFVDAQPDEQEKGRFVY-----	437
AAZ06661_V._luteola	VEKLIKKQSQSHFVDAQPDEQEKGRFVY-----	437
Vigna_unguiculata	<u>VEKLINKQSDSHFTDHSSKREERV-----</u>	433
	*:	

Figura 3: Continuação.

4.3 Extração de DNA total

As extrações de DNA total foram feitas baseando-se no protocolo descrito por Warner (1996). Imediatamente antes da extração, as folhas a serem utilizadas foram coletadas e devidamente pesadas, sendo utilizados cerca de 2 g de material vegetal para cada genótipo.

Para a extração do DNA total, o material foi macerado com auxílio de nitrogênio líquido até a formação de uma farinha fina e branca. A farinha obtida foi misturada a 6 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100mM, pH 8,0 contendo CTAB 2%, EDTA 25 mM e NaCl 2 M), pré-aquecido a 65 °C. A mistura foi mantida a 65 °C por 60 minutos sob agitação esporádica. Em seguida, foram adicionados aos extratos 6 mL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 15 minutos, sob agitação esporádica, sendo, posteriormente, centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos a 25 °C (rotor F-34-6-38, centrífuga eppendorf 5810 R). A fase aquosa superior (cerca de 6 mL) foi transferida para um novo tubo e depois foram adicionados 4 mL de álcool isopropílico 100% (v/v) gelado. Em seguida, as amostras foram incubadas a 4 °C por 8 horas. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 mL de NaCl 1 M ao precipitado. Foram adicionados mais 5 mL de etanol 100% (v/v) gelado e, em seguida, as amostras foram incubadas a 4 °C por 1 hora. Depois desse intervalo, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v), sendo centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos a 4 °C após cada lavagem. Por fim, o precipitado de DNA foi ressuspenso com 2 mL de água ultrapura estéril. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.4 PCR

Para conseguir amostras da região de interesse do gene da vicilina de *Vigna unguiculata* foi realizada uma PCR (reação em cadeia da DNA polimerase). Nesta reação foram utilizados os iniciadores específicos, já construídos e adquiridos, para a vicilina (Vic1 e Vic2).

A quantidade de DNA total utilizada como molde para a reação foi de 1.000 ng para cada amostra. A PCR iniciou com um aquecimento de 94 °C por 2 minutos, em seguida inicia-se uma outra etapa constituída de 35 ciclos, cada ciclo contendo uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, uma de anelamento a 62 °C por 1 minuto e uma terceira etapa de extensão a 72 °C por 1 minuto. No último ciclo, o tempo da etapa de extensão (a 72 °C) foi de 7 minutos. As reações foram realizadas em um termociclador Amplitherm Tx96-plus.

4.5 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização do DNA total extraído, dos produtos de PCR, dos plasmídeos purificados e dos produtos digeridos, pequenas alíquotas das amostras foram aplicadas em gel de agarose em tampão TAE (Tris-Acetato 45mM, EDTA 1mM, pH 8,0), e a eletroforese realizada com o gel submerso no mesmo tampão, contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL a uma corrente constante de 80 mA por cerca de 35 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas por exposição do gel a luz ultravioleta ($\lambda = 302$ nm) em um fotodocumentador Vilber Lourmat (Biosystems).

4.6 Clonagem da sequência codificadora da vicilina

O produto amplificado originário da PCR previamente realizada com os iniciadores específicos foi então ligado ao plasmídeo pGEM-T Easy de acordo com as especificações do fabricante. A ligação foi realizada a 4 °C por 14 horas, estando as amostras incubadas no termociclador. Após a ligação, os produtos foram eletroporados a 2.500 V (Eletroporador 2510, Eppendorf, Alemanha) em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP 10 F'. Logo após, foi adicionado ao eletroporado 1 mL de meio SOC (triptona 2,0%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, Glucose 20 mM, pH 7,0), pré-aquecido a 37 °C. As células foram incubadas a 37 °C por 1 hora a 180 rpm. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, 100 µL da solução contendo as células eletroporadas com os produtos de ligação foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB ágar contendo carbenicilina 100 µg/mL, estreptomicina 50 µg/mL, IPTG 0,5 mM e X-Gal 80 µg/mL. Após a incubação a 37 °C, por 16 horas, observou-se o crescimento de colônias brancas e azuis. Para a confirmação da transformação, colônias brancas foram selecionadas ao acaso para extração de plasmídeos, e posterior digestão com enzima de restrição específica.

4.7 Extração de plasmídeo

As extrações de plasmídeo foram realizadas selecionando-se uma colônia isolada e inoculando-a em 5 mL de caldo LB líquido suplementado com carbenicilina 100 µg/mL e estreptomicina 50 µg/mL. Os inóculos foram incubados a 37 °C, por 16 horas, sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento das culturas, as células foram coletadas por centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 25 °C (centrífuga minispin Eppendorf) em microtubos de 2 mL. Os plasmídeos foram extraídos e purificados de acordo com o método (adaptado) de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0) e a essa suspensão foram adicionados 300 µL de solução de lise (NaOH 0,2 N, SDS 1%). Os tubos foram invertidos

sete vezes para a homogeneização da solução e incubados em banho de gelo por exatos 5 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada lisado 200 μ L de acetato de potássio 3 M e os tubos foram novamente invertidos, sete vezes, para a homogeneização da solução. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, a 25 °C, os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL. Aos volumes transferidos, foram adicionados 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v), sendo os tubos invertidos depois, sete vezes, para otimizar o contato da solução de clorofórmio com o sobrenadante transferido. Os tubos ficaram repousando à temperatura ambiente por 5 minutos, e depois o sobrenadante (fase superior) foi transferido para outro tubo de 1,5 mL. Foram então adicionados 2 volumes de etanol 100% (v/v) gelado, invertido os tubos depois para homogeneizar a solução, e incubando-os em banho de gelo por 10 minutos. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% (v/v), sendo novamente centrifugado nas mesmas condições citadas. O sobrenadante foi, novamente, descartado e, após a completa evaporação do etanol, os plasmídeos foram recuperados em 70 μ L de água ultrapura estéril.

4.8 Sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento foi realizada na Macrogen – Macrogen Sequencing Team (Seul, República da Coreia), sendo utilizados os iniciadores para sequenciamento SP6 (5'- ATTTAGGTGACACTATAG -3') e T7promoter (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'). Todas as amostras de plasmídeos purificados foram enviados na concentração de 100 μ g/mL. As sequências (produtos das reações de sequenciamento) foram analisadas e montadas com o auxílio do pacote *Phred/Phap/Consed* (EWING et al., 1998) para a obtenção das sequências consenso de cada um dos clones. As sequências dos diferentes clones foram editadas e alinhadas com o auxílio dos programas *Clustal-Omega* (SIEVERS et al., 2014) e *Jalview* (WATERHOUSE et al., 2009), e as mutações foram observadas e analisadas.

4.9 Modelagem por homologia

A escolha da proteína molde para a modelagem por homologia da vicilina do feijão-de-corda foi realizada de acordo com o critério padrão de preferência pela estrutura 3D disponível de maior similaridade. Para tal, a sequência de aminoácidos da vicilina, deduzida a partir da sequência de DNA previamente depositada no GenBank (número de acesso AM905848) foi comparada ao banco de dados de estruturas resolvidas (protein database – PDB) através da ferramenta de busca e alinhamento *HHpred* (SODING et al., 2005) (toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred). Dessa forma, a estrutura que apresentou maior identidade à proteína de interesse (isso referente as sequências de cada clone) foi uma globulina 7S de *Vigna angularis* (código de acesso 2EA7) resolvida a uma resolução de 1,8 Å por Fukuda et al. (2008).

Para cada clone e para a vicilina nativa, foi gerado 1 modelo utilizando o programa *Modeller* (SALI e BLUNDELL, 1993). Utilizando a interface online do programa, encontrado em: toolkit.tuebingen.mpg.de/modeller, o método utilizado foi a randomização inicial das coordenadas do modelo e sua consequente otimização, no final escolhendo o modelo com o melhor escore de minimização de energia. Para cada modelo foi feito um mapa de Ramachandran (RAMACHANDRAN, et al., 1963) utilizando a ferramenta online *MolProbity* (DAVIS et al., 2007). O mapa de Ramachandran mostra a distribuição dos ângulos torsionais ϕ e ψ para cada aminoácido. Há regiões energeticamente favoráveis para cada resíduo, e a presença de um aminoácido fora dessas regiões indica um erro ou algum fenômeno não convencional naquele local, como uma forte interação causando o deslocamento.

O GalaxyWEB é um servidor com ferramentas online que executam diversas tarefas relacionadas a estrutura de proteínas. Foram utilizados o *GalaxyGemini* (LEE et al., 2013) para a predição da estrutura multimérica dos modelos de vicilina e o *GalaxySite* (HEO et al., 2014) para um estudo sobre as regiões potencialmente ligantes a quitina.

A análise dos modelos escolhidos foi feita através do software *UCSF Chimera* (PETTERSEN et al., 2004), responsável pela visualização das ilustrações dos modelos.

5. RESULTADOS

5.1 Extração de DNA total, PCR e reação de ligação

As amostras de DNA total dos genótipos IT81D-1053 e EPACE-10 foram diretamente utilizadas na PCR com os iniciadores específicos para a vicilina. Uma vez realizada a reação, poderia ser confirmado se de fato a extração de DNA foi satisfatória, assim como evidenciar que de fato ocorreu a amplificação da sequência desejada. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (fig. 3). O produto amplificado tem em torno de 900 pares de base. A sequência de interesse tem em torno de 620 pares de base, mas como se trata de um produto amplificado a partir de DNA genômico, significa que os íntrons também estão presentes na sequência.

O produto da PCR foi então ligado ao plasmídeo pGEM-T Easy. A análise posterior em gel de agarose 1,0% (fig. 4) mostra que a reação ocorreu com sucesso. A banda maior tem em torno de 3900 pares de base, confirmando assim que o inserto (produto da PCR) se ligou efetivamente ao plasmídeo.



Figura 4: Produtos da PCR com iniciadores específicos de vicilina e produtos da reação de ligação com pGEM-T Easy; E = produto do DNA genômico do genótipo EPACE-10. I = produto do DNA genômico de IT81D-1053. LE = plasmídeo ligado ao produto do EPACE-10. LI = plasmídeo ligado ao produto do IT81D-1053. C- = controle negativo (ausência de amostra). M = marcador molecular Ladder 1Kb.

5.2 Clonagem e sequenciamento

Após a ligação dos produtos de PCR no plasmídeo pGEM-T Easy, foram obtidos 16 clones recombinantes a partir dos produtos amplificados do genótipo suscetível EPACE-10 (clones S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16) e 16 clones a partir dos produtos amplificados do genótipo resistente IT81D-1053 (clones R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16). Dentre todos esses clones, aqueles denominados de S14, S15, S16, R2, R4, R13 foram perdidos no processo de extração e purificação do plasmídeo recombinante devido a um defeito no tudo de 1,5 mL que acabou acarretando na perda da amostra.

Depois do processo de extração plasmidial, para confirmar se tais clones realmente tinham o plasmídeo com o inserto ligado, foi realizada uma reação de digestão com a enzima de restrição EcoRI. As amostras de cada clone após a digestão foram analisadas em um gel de agarose 1,0% (fig. 5). A confirmação se deu quando foi evidenciada a presença de duas bandas no padrão de corrida de cada amostra, sendo uma banda com maior quantidade de pares de base referente ao plasmídeo, e outra banda, com menos pares de base, referente ao inserto. Apenas os clones S4, S5, S6, S8, S10, R1, R3, R5, R7, R10, R11, R15 e R16 apresentaram o produto amplificado inserido no plasmídeo (fig. 4), e foram estes os clones enviados para o sequenciamento.

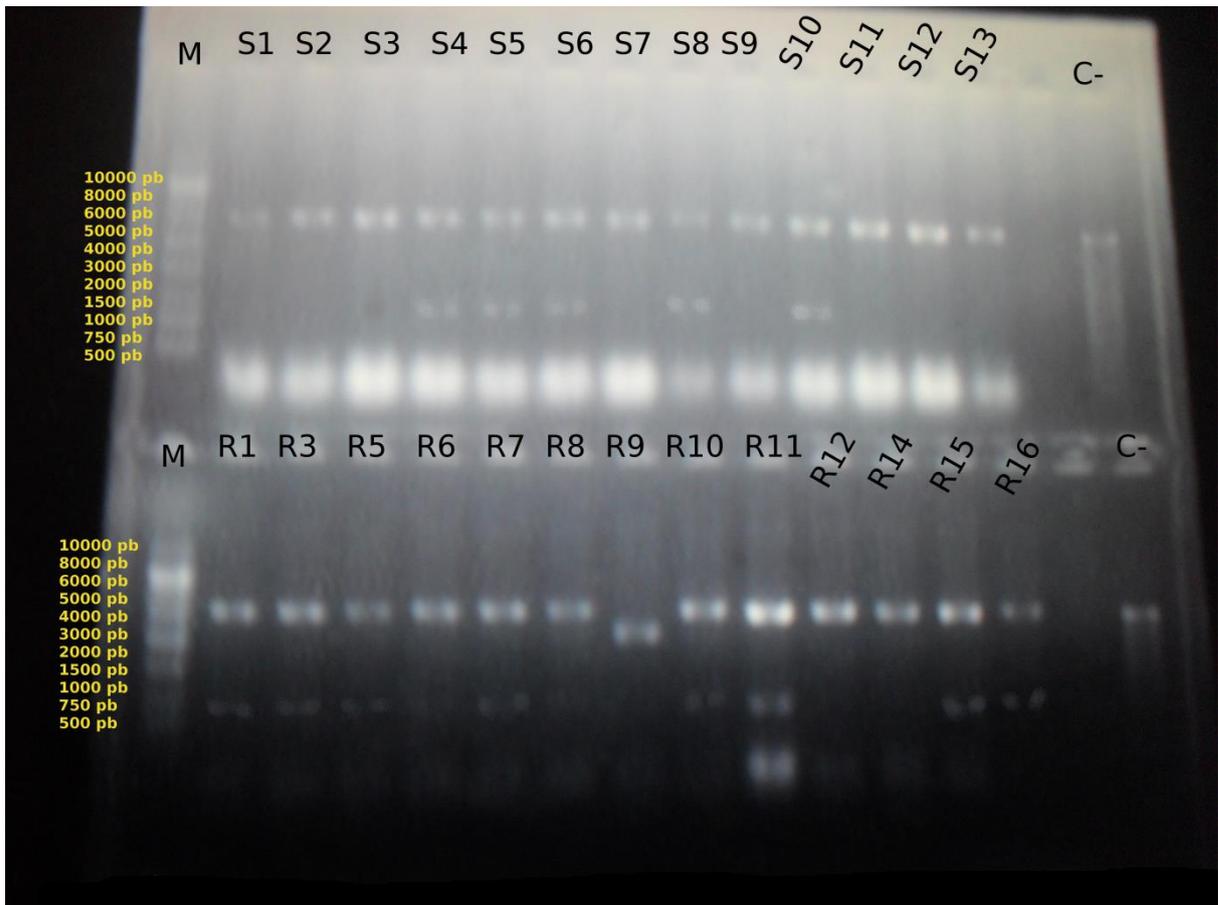


Figura 5: Reação de digestão dos plasmídeos extraídos dos clones resistentes e suscetíveis com a enzima EcoRI. Apenas os clones S4, S5, S6, S8, S10, R1, R3, R5, R7, R10, R11, R15 e R16 apresentaram o inserto ligado ao pGEM-T Easy. C- = controle negativo (ausência de amostra). M = marcador molecular Ladder 1Kb.

5.3 Análise e avaliação dos modelos estruturais

As sequências foram editadas com o auxílio do programa *Jalview* (WATERHOUSE et al., 2009) para a remoção dos íntrons e alinhadas com o programa *Clustal-Omega* (SIEVERS et al., 2014). As sequências de aminoácidos codificadas pelos clones foram deduzidas a partir das sequências de DNA e alinhadas com a sequência de referência da vicilina de *V. unguiculata* (fig. 5). Os clones apresentaram várias mutações pontuais entre si. Os clones R3 e R15 apresentaram sequências idênticas, e estes também mostraram um padrão de mutação (diferenças na sequência) maior em relação aos outros clones. A maior diferença estava em regiões ricas em glutaminas. De acordo com o alinhamento entre os clones (fig. 5), foram criados modelos para o estudo da estrutura tridimensional da proteína. Aqueles clones com sequências idênticas são representados em apenas um modelo (tab. 2). Para cada sequência divergente foi criado um modelo tridimensional utilizando o programa *Modeller* (SALI e BLUNDELL, 1993), e cada modelo estrutural criado foi avaliado no *MolProbity* (DAVIS et al., 2007), onde foi criado um gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN et al., 1963) para cada um.

Os escolhidos para o estudo comparativo das estruturas de vicilinas do genótipo resistente e vicilinas do genótipo suscetível foram os modelos M6, M8 e M9. Para a geração destes, as sequências foram completadas com a sequência VuVic. O modelo M8 é a estrutura da vicilina suscetível, sendo esta comum para quase todos os clones de sequências suscetíveis estudados. O modelo M6 é a estrutura comum da vicilina resistente. Em relação aos outros modelos com sequências do genótipo IT81D-1053, as diferenças estão apenas em mutações pontuais (exceto o modelo M9) que não produzem nenhuma diferença significativa na estrutura da proteína. E por fim o modelo M9 é aquele com uma sequência diferenciada dos demais modelos suscetíveis, principalmente em regiões específicas ricas em glutamina.

Os modelos triméricos foram gerados no *GalaxyGemini* (LEE et al., 2013) (fig.11, 13 e 15), e a previsão de ligantes foi feita pelo *GalaxySite* (HEO et al., 2014). O resultado da análise foi idêntico para todos os modelos. Tal análise encontrou locais potencialmente ligantes a radicais fosfato e radicais eletronegativos como grupamentos amínicos e carboxílicos, sendo que a região variável de glutaminas foi indicada como potencial ligante a esses grupos eletronegativos.

```

R3      -----
R15     -----
S4      -----
S6      -----
S8      -----
S10     -----
R11     -----
R16     -----
R10     -----
R5      -----
R1      -----
S5      -----
R7      -----
VuVic   VPLLLLGVLF LASLSV SFGIVHRGHQESQEESEPRGQNNPFYFDSDRWFHTLFRNQYGH L

R3      -----
R15     -----
S4      -----
S6      -----
S8      -----
S10     -----
R11     -----
R16     -----
R10     -----
R5      -----
R1      -----
S5      -----
R7      -----
VuVic   RVLQRF DQRSKQIQNL ENYRVVEFQSKPNTLLLP HHADADFLLVVLNGRAILTLVNP DGR

R3      -----VPVNNPH I FQDFFLS STEAQQSYL
R15     -----VPVNNPH I FQDFFLS STEAQQSYL
S4      -----VPVNNPHRFQDFFLS C TEAQQSYL
S6      -----VPVNNPHRFQDFFLS C TEAQQSYL
S8      -----VPVNNPHRFQDFFLS C TEAQQSYL
S10     -----VPVNNPHRFQDFFLS C TEAQQSYL
R11     -----VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL
R16     -----VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL
R10     -----VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL
R5      -----VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL
R1      -----VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL
S5      -----VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL
R7      -----VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL
VuVic   DSYILEQGH AQKTPAGTTFFLVNHDDNENLRIVKLA VPVNNPHRFQDFFLS STEAQQSYL

```

Figura 6: Alinhamento das sequências de aminoácidos de cada clone. As diferenças entre as sequências estão destacadas em amarelo.

R3 QGFSKNVLEASFDTEFKEINRVLFGDEE--QQGEESQQEGVIVELKREQUIRELIKHA^SS
R15 QGFSKNVLEASFDTEFKEINRVLFGDEE--QQGEESQQEGVIVELKREQUIRELIKHA^SS
S4 QGFSKNILEAS^{SG}SDYKEINRVLFG^{EEEEQQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
S6 QGFSKNILEAS^{SG}SDYKEINRVLFG^{EEEEQQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
S8 QGFSKNILEAS^{SG}SDYKEINRVLFG^{EEEEQQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
S10 QGFSKNILEAS^{SG}SDYKEINRVLFG^{EEEEQQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
R11 QGFSKNILEAS^FSDYKEINRVLFG^{EEEEQQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
R16 QGFSKNILEAS^FSDYKEINRVLFG^{EEEEQQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
R10 QGFSKNILEAS^FSDYKEINRVLFG^{EEEEQQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
R5 QGFSKNILEAS^FSDYKEINRVLFG^{EEEEQ}^{KQQ}GEESQQEGVIVELKREQUIRELMKHA^SST
R1 QGFSKNILEAS^FSDYKEINRVLFG^{EEEEQ}^{KQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
S5 QGFSKNILEAS^FSDYKEINRVLFG^{EEEEQ}^{KQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST
R7 QG^VSKNILEAS^FSDYKEINRVLFG^{EEEEQ}^{KQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIREVMKHA^SST
VuVic QGFSKNILEAS^FSD^FKEINRVLFG^{EEEEQ}^{KQQ}DEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHA^SST

R3 S^RKAL^PS-QNEPFNL^{IN}RKPIY^{AN}KFGRL^{FE}ITPEN^{NR}QL^KDLDFV^{IS}YVDMK^Q^SLLI^P
R15 S^RKAL^PS-QNEPFNL^{IN}RKPIY^{AN}KFGRL^{FE}ITPEN^{NR}QL^KDLDFV^{IS}YVDMK^Q^SLLI^P
S4 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
S6 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
S8 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
S10 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
R11 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
R16 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
R10 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
R5 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
R1 SKKSLSS-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
S5 SKKSLSS-QNEPF^SLRSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
R7 SKKSLSS-QNEPFNLSQK^LIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVDMKEGGL^{LM}P
VuVic SKKSLST-QNEPFNLSQKPIYSNKFGR^{LHE}ITPEKNPQLRDLDFV^{LT}SVD^IKEGGL^{LM}P

R3 HYSN^RAR^VIA^{VV}^{IE}^{GD}^{GK}^LELVGQRE^{QQ}^K^{QQQ}-EQQ--EQEE^RWEM^QRYRAE^LSEDDV^F^I
R15 HYSN^RAR^VIA^{VV}^{IE}^{GD}^{GK}^LELVGQRE^{QQ}^K^{QQQ}-EQQ--EQEE^RWEM^QRYRAE^LSEDDV^F^I
S4 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
S6 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
S8 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
S10 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
R11 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
R16 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
R10 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
R5 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
R1 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
S5 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
R7 NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^{ED}DDV^F^V
VuVic NYNSKAIVILVVNKGEANIELVGQRE^{QQQ}-----QQEESWEVQRYRAEVS^DDDV^F^V

Figura 6: Continuação.

```

R3      IPTAYPVAIT-----
R15     IPTAYPVAIT-----
S4      IPASYPVAIT-----
S6      IPASYPVAIT-----
S8      IPASYPVAIT-----
S10     IPASYPVAIT-----
R11     IPASYPVAIT-----
R16     IPASYPVAIT-----
R10     IPASYPVAIT-----
R5      IPASYPVAIT-----
R1      IPASYPVAIT-----
S5      IPASYPVAIT-----
R7      IPASYPVAIT-----
VuVic   IPASYPVAITATATSNLNFIAFGINAENNQRNFLAGEEDNMSEIPTEVLDVTFPASGEKVE

```

```

R3      -----
R15     -----
S4      -----
S6      -----
S8      -----
S10     -----
R11     -----
R16     -----
R10     -----
R5      -----
R1      -----
S5      -----
R7      -----
VuVic   KLINKQSDSHFTDHSSKREERV

```

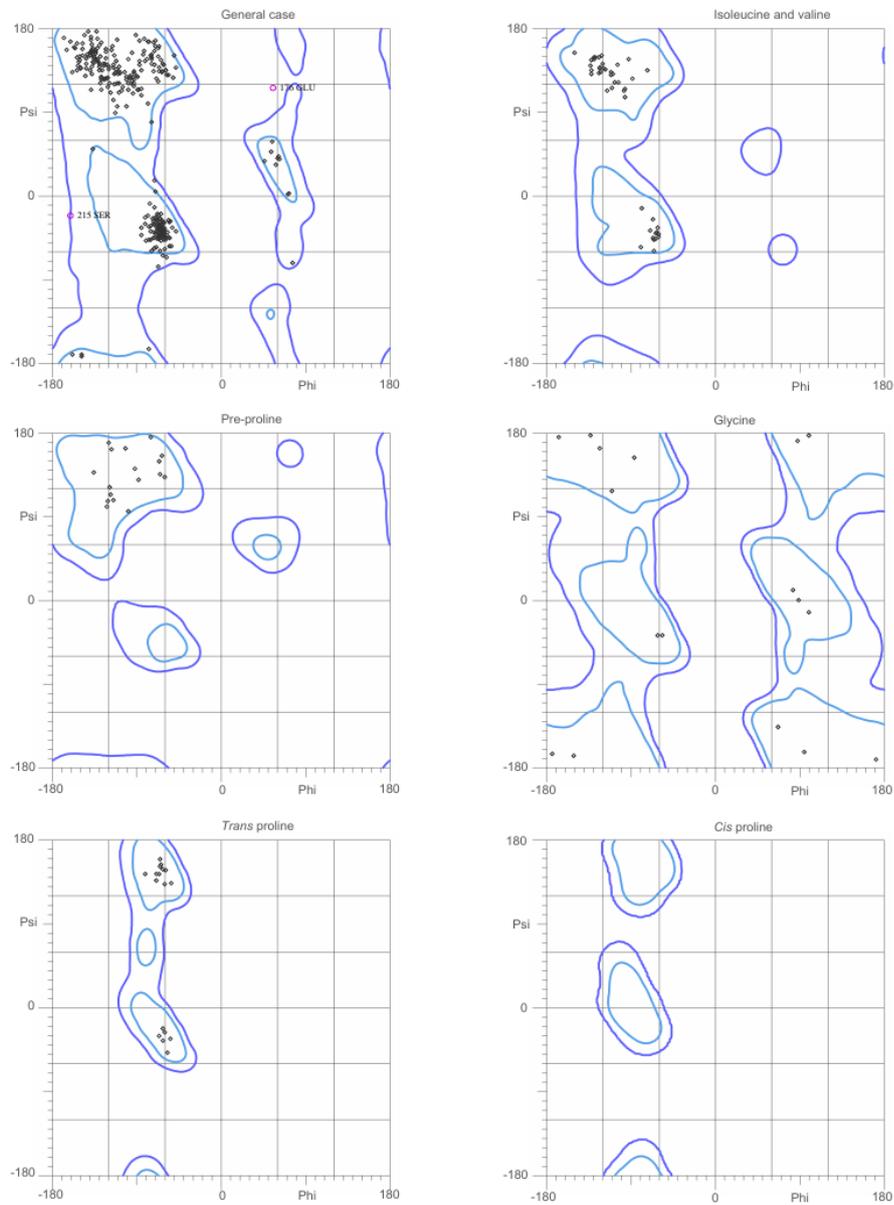
Figura 6: Continuação.

Modelos	Clones
M1	VuVic
M2	R7
M3	S5
M4	R1
M5	R5
M6	R10
M7	R11; R16
M8	S4; S6; S8; S10
M9	R3; R15

Tabela 2: Respective clones of each model. According to the differences between the sequences of each clone, these were grouped for the subsequent elaboration of the structural model.

MolProbity Ramachandran analysis

M6modelo.pdb, model 1



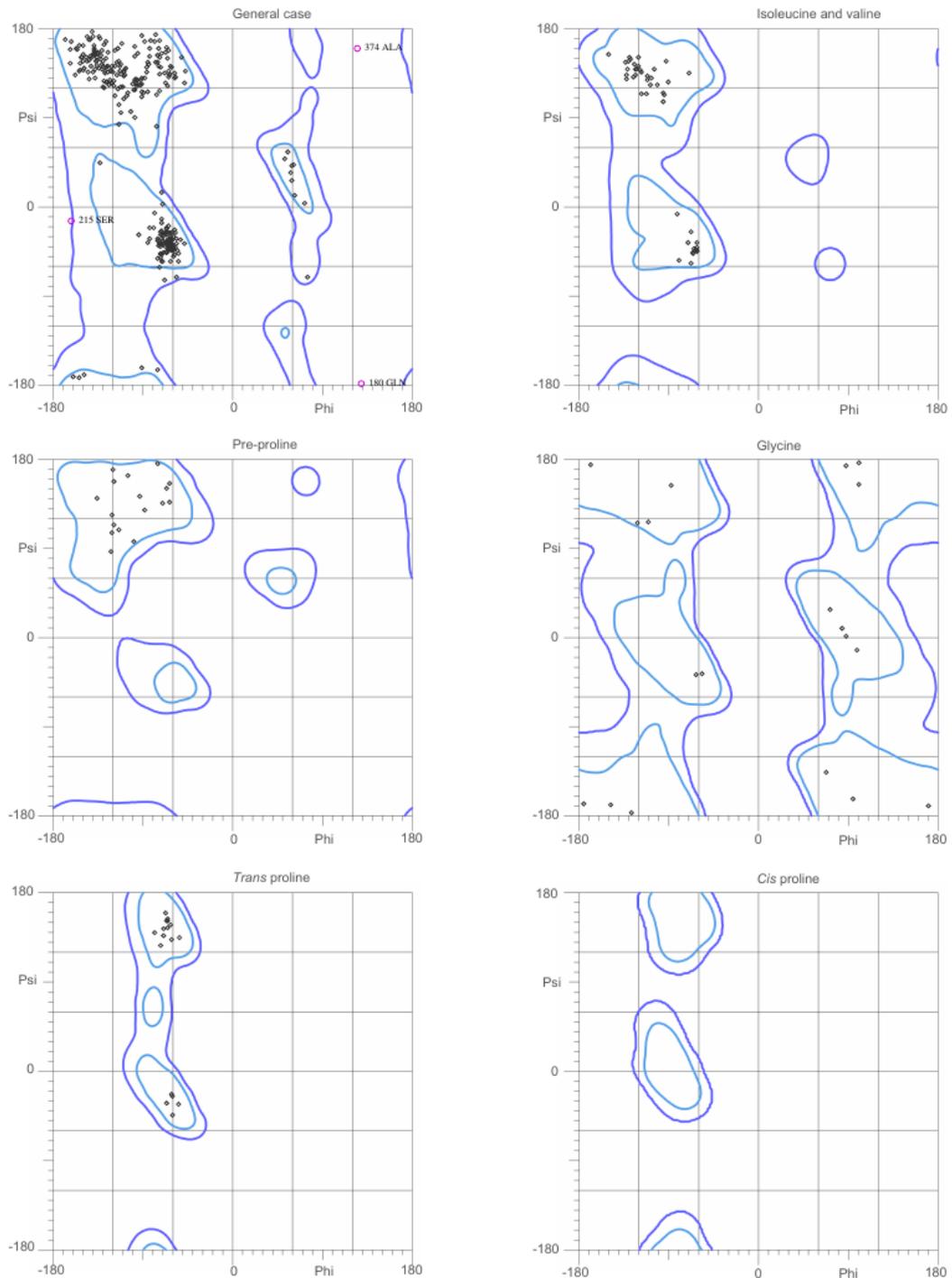
97.7% (386/395) of all residues were in favored (98%) regions.
 99.5% (393/395) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 2 outliers (phi, psi):
 176 GLU (55.1, 117.1)
 215 SER (-162.8, -21.6)

Figura 7: Gráfico de Ramachandran do modelo M6 feito na ferramenta MolProbity.

MolProbity Ramachandran analysis

M8modelo.pdb, model 1



97.5% (385/395) of all residues were in favored (98%) regions.
99.2% (392/395) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 3 outliers (phi, psi):

180 GLN (129.3, -179.3)

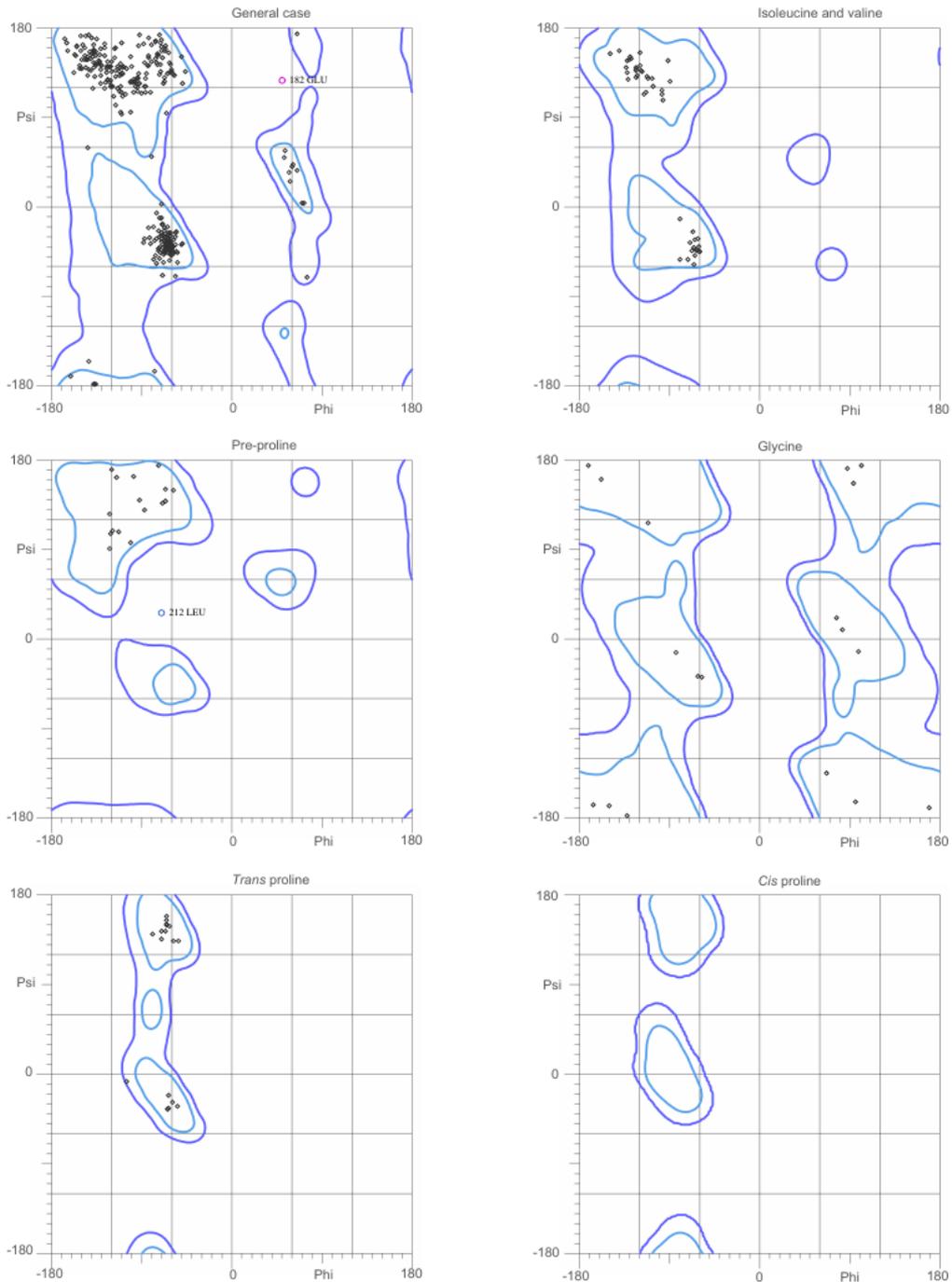
215 SER (-163.8, -14.7)

374 ALA (125.8, 161.2)

Figura 8: Gráfico de Ramachandran do modelo M8 feito na ferramenta MolProbity.

MolProbity Ramachandran analysis

M9modelo.pdb, model 1



97.0% (386/398) of all residues were in favored (98%) regions.
 99.5% (396/398) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 2 outliers (phi, psi):
 182 GLU (50.4, 128.2)
 212 LEU (-71.8, 27.8)

Figura 9: Gráfico de Ramachandran do modelo M9 feito na ferramenta MolProbity.



Figura 10: Modelo (M6) da estrutura tridimensional da vicilina de *Vigna unguiculata*. As regiões destacadas em vermelho são aquelas ricas em glutaminas. Os grupos-R dos resíduos dessas regiões também estão destacados.



Figura 11: Disposição da estrutura trimérica do modelo M6, com as regiões ricas em glutamina destacadas em vermelho.



Figura 12: Modelo (M8) da estrutura tridimensional da vicilina de *Vigna unguiculata*. As regiões destacadas em vermelho são aquelas ricas em glutaminas. Os grupos-R dos resíduos dessas regiões também estão destacados.

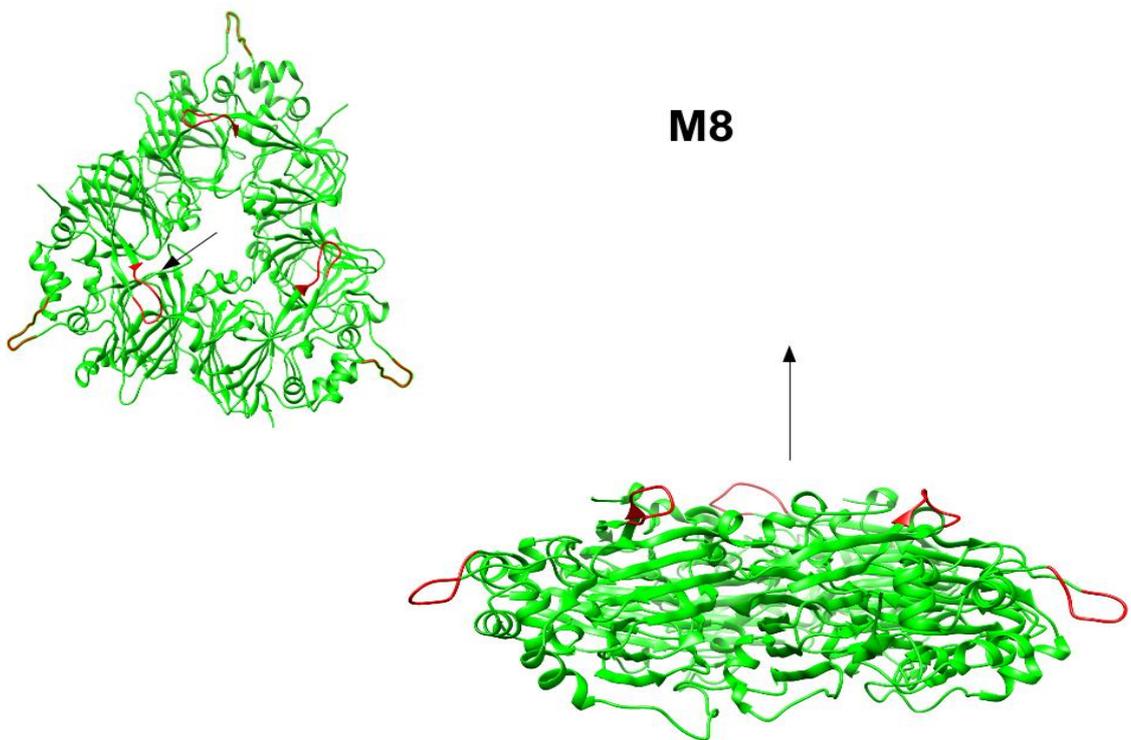


Figura 13: Disposição da estrutura trimérica do modelo M8, com as regiões ricas em glutamina destacadas em vermelho.

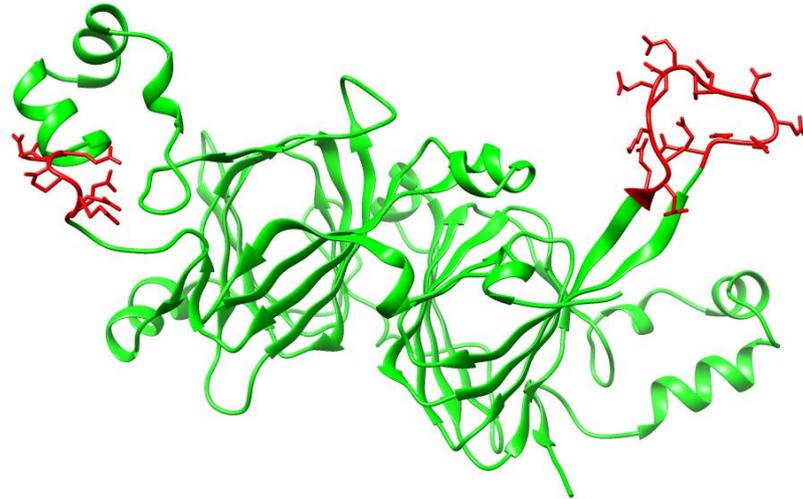


Figura 14: Modelo (M9) da estrutura tridimensional da vicilina de *Vigna unguiculata*. As regiões destacadas em vermelho são aquelas ricas em glutaminas. Os grupos-R dos resíduos dessas regiões também estão destacados.

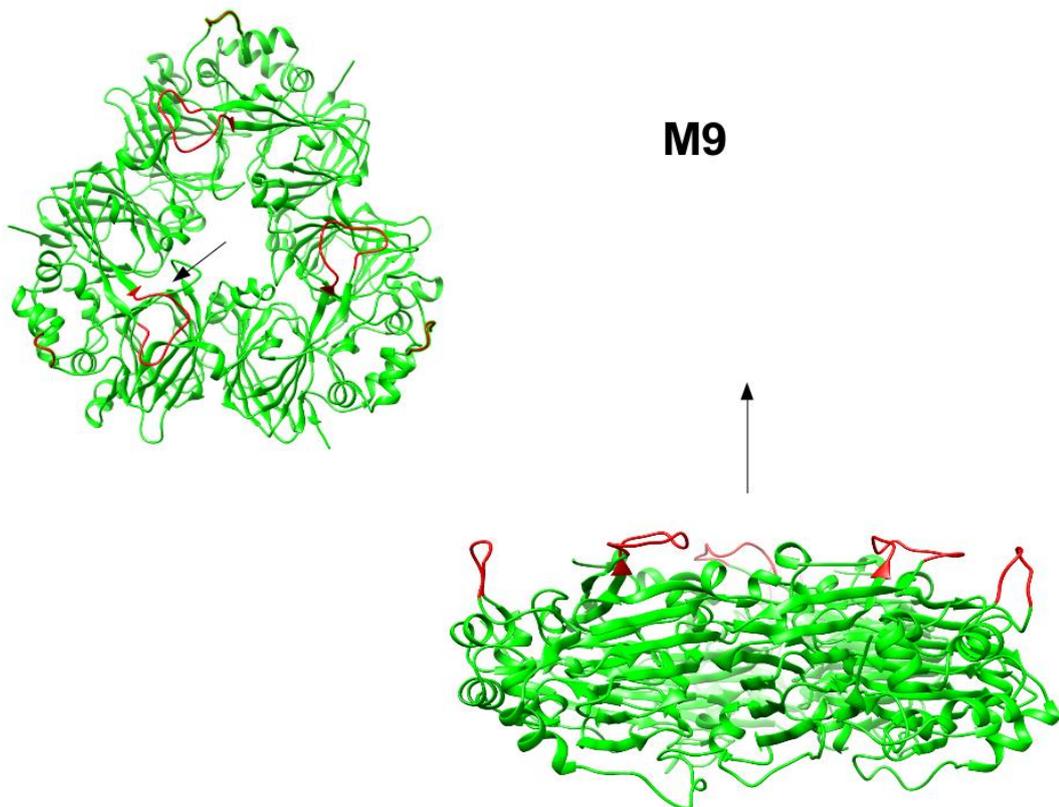


Figura 15: Disposição da estrutura trimérica do modelo M9, com as regiões ricas em glutamina destacadas em vermelho.

6. DISCUSSÃO

De acordo com os modelos estruturais construídos é notável a variabilidade estrutural das vicilinas de uma mesma espécie. A combinação de múltiplos genes estruturais e um extensivo processo pós-traducional resulta em um alto grau de polimorfismo para essas proteínas (GIBBS et al., 1989; HIGGINS, 1984; XIE et al., 2011). Além de serem codificadas por uma família multigênica, as vicilinas exibem uma quantidade considerável de sequências homólogas e micro-heterogeneidades, também podendo contribuir em mecanismos de defesa de plantas (DUNWELL et al., 2001; FALL et al., 2003; SHEWRY, 1995).

As vicilinas parecem ter um papel fundamental na defesa de *Vigna unguiculata* contra o caruncho *Callosobruchus maculatus* (MACEDO et al., 1993). E isso se deve ao fato das vicilinas terem a capacidade de se ligar a quitina (MOTA et al., 2003; MOURA et al., 2007).

Comparando as sequências de vicilinas de diferentes espécies próximas filogeneticamente, elas são bastante conservadas apresentando poucas variações. Mas existem duas regiões ricas em glutaminas que têm um grau de variação considerável. Considerando que dentro de uma mesma espécie existem variantes suscetíveis ao ataque de insetos, como, por exemplo, o gorgulho, e outras variantes resistentes, é provável que se essa resistência é de fato conferida pelas vicilinas, então a resistência será conferida dependendo da sequência de aminoácidos nestas regiões.

Já foram feitos trabalhos que evidenciavam a ligação da vicilina a membrana peritrófica de insetos (PAES et al., 2008; SOUZA et al., 2010; UCHÔA et al., 2006). A membrana peritrófica reveste os órgãos internos de insetos e é bastante evidente no revestimento interno do intestino (TERRA, 2001). Sales et al., (2001) demonstrou que a vicilina de *Vigna unguiculata* se liga fortemente à membrana peritrófica do caruncho *Callosobruchus maculatus* e que esta resiste de modo considerável a ação das enzimas digestivas do inseto. Alguns autores sugerem que a resistência à ação de proteases é devido a forma compacta e de voltas (*loop*) curtas características do domínio cupina (DUNWELL et al., 2004). A falta de voltas extensas na superfície significa que poucos sítios são acessíveis a enzimas capazes de clivar a proteína. Outros sugerem que é devido ao caráter ácido que a

proteína apresenta (DE SALES et al., 1992).

Em relação à capacidade de se ligar a quitina, Maruyama et al., (2001) sugere um modelo de como uma β -conglucina de soja (*Glycine max*) pode se ligar a resíduos de N-acetilglucosamina (fig. 16). Em vicilinas de *Vigna unguiculata* o mecanismo deve ser parecido, uma vez que os resíduos de glutamina possuem átomos muito eletronegativos como o oxigênio e o nitrogênio no final de sua cadeia residual, as ligações de hidrogênio devem ser favoráveis aos átomos de oxigênio expostos na N-acetilglucosamina.

Observando os modelos M6, M8 e M9, as regiões ricas em glutamina se apresentam de formas diferentes estereoquimicamente. Essas regiões em M6 e M8 estão mais expostas longitudinalmente, ao contrário do modelo M9, no qual essas regiões parecem estar mais expostas axialmente em relação a estrutura trimérica da proteína. Como M9 é constituído de sequências que foram encontradas somente no genótipo resistente, isso pode ser um indício de como é a proteína que confere, de forma eficiente, a resistência ao *C. maculatus*, assim como o mecanismo de ligação a quitina é efetuado. Observando como as regiões ricas em glutamina estão expostas em M9, parece que todas se expõem seguindo um sentido axial em relação a estrutura proteica. Dessa forma, a chance de encontrar sítios ligantes na quitina é maior, e conseqüentemente a ligação à quitina seria mais forte, pois todas essas regiões parecem apontar num único sentido. A conformação apresentada em M6 e M8 não é muito favorável para que haja a possibilidade de vários sítios de ligação, pois tais regiões ficam expostas de forma que não existe um eixo único de direção que favoreça todas as regiões encontrem ligantes de forma simultânea.

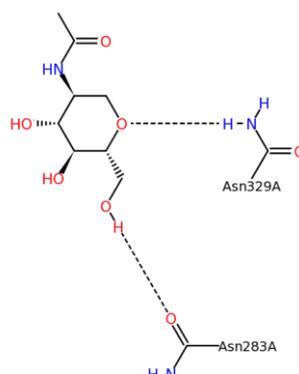


Figura 16: Esquema sugerido por Maruyama et al. (2001) de como se dá a ligação de resíduos de aminoácidos à resíduos de N-acetilglucosamina através de ligações de hidrogênio.

7. CONCLUSÃO

As vicilinas encontradas no genótipo resistente são diferentes às do genótipo suscetível. Porém não podemos chegar num resultado conclusivo, pois como as vicilinas são codificadas por uma família multigênica, é necessário ter um estudo mais aprofundado de sua sequências para evidenciar de fato essas diferenças. O estudo dos modelos estruturais sugerem uma conformação otimizada para a ligação com a quitina por parte das vicilinas de genótipo resistente em relação as vicilinas de genótipo suscetível. No entanto é necessários estudos mais detalhados tanto *in silico* quanto *in vitro* para que se possa ter uma idéia mais concreta de como o mecanismo de ligação a quitina se processa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, T. A.; NIELSEN, S. S.; SHADE, R. E.; SINGH, B. B. Physical and chemical attributes of cowpea lines resistant and susceptible to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 25, p. 1-8, 1989.

BARRETO, P. D. Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: avanços e perspectivas. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido**, 1999.

BASTOS, J. A. M. **Principais pragas das culturas e seus controles**. v. 3, p. 149-151, 1968.

CAJAZEIRAS, J. B. **Identificação de genótipos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] resistente ao caruncho (*Callosobruchus maculatus* Fabr., 1792)**. 2000. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Ceará, Fortaleza, 2000.

CREDLAND, P. F. Effect of host availability on reproductive performance in *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 22, p. 49-54, 1986.

DAPAAH, H. K. et al. Yield stability of cassava, maize, soya bean and cowpea intercrops. **Journal of Agricultural Science**, v. 140, n. 1, p. 73–82, fev. 2003.

DAVIS, I. W. et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W375–W383, 8 maio 2007.

DE FREITAS FERNANDES, C. et al. Ocorrência do vírus do mosaico severo (Cowpea severe mosaic virus-CPSMV) no feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] em Rondônia. 2010.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Rendimento produtivo e econômico do feijão-caupi em função de doses de potássio. 2009.

DE SALES, M. P.; R MACEDO, M. L.; XAVIER-FILHO, J. Digestibility of cowpea (*Vigna*

unguiculata) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 945–950, 1992.

DIOUF, D. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]“omics” research for genetic improvement. **Afr. J. Biotechnol**, v. 10, n. 15, p. 2803–2810, 2011.

DUNWELL, J. M. et al. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. **Trends in biochemical sciences**, v. 26, n. 12, p. 740–746, 2001.

DUNWELL, J. M.; PURVIS, A.; KHURI, S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 7–17, jan. 2004.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, n. 1, p. 31–45, 1997.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1 mar. 1998.

FALL, L. et al. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 48–50, 2003.

FAN, Q. et al. Participation of the Cowpea mosaic virus protease in eliciting extreme resistance. **Virology**, v. 417, n. 1, p. 71–78, ago. 2011.

FOX, C. W. Multiple mating, lifetime fecundity and female mortality of the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Functional Ecology**, v. 7, p. 203–208, 1993.

FREIRE-FILHO, F. R. **Origem, evolução e domesticação do caupi**. 1ª edição, Fortaleza, 1988.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1682–1687, mar. 2004.

FUKUDA, T.; MARUYAMA, N.; SALLEH, M. R.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S. Characterization and crystallography of recombinant 7S globulins of Adzuki bean and structure-function relationships with 7S globulins of various crops. *J. Agric. Food Chem.* v. 56, p. 4145–4153, 2008.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A.; DOBIE, A. M.; KILMINSTER, A. M.; BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **J. Sci. Food Agric.** v. 30, p. 948–958, 1979.

GIBBS, P. E.; STRONGIN, K. B.; MCPHERSON, A. Evolution of legume seed storage proteins—a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. **Molecular biology and evolution**, v. 6, n. 6, p. 614–623, 1989.

GUIMARÃES, F. V. A. et al. Calcium can moderate changes on membrane structure and lipid composition in cowpea plants under salt stress. **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. 1, p. 55–63, 20 fev. 2011.

HEO, L. et al. GalaxySite: ligand-binding-site prediction by using molecular docking. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W210–W214, 1 jul. 2014.

HIGGINS, T. J. V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 191–221, 1984.

HILAL, M. et al. Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. **Plant physiology**, v. 117, n. 2, p. 695–701, 1998.

KHURI, S.; BAKKER, F. T.; DUNWELL, J. M. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 4, p. 593–605, 2001.

LEE, H. et al. GalaxyGemini: a web server for protein homo-oligomer structure prediction based on similarity. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1078–1080, 15 abr. 2013.

LIMA, J. A. A. et al. Crotalaria paulinea, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 04, p. 429–433, 2005.

MACEDO, M. L. R. et al. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 105, n. 1, p. 89–94, 1993.

MARUYAMA, N. et al. Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 12, p. 3595–3604, 2001.

MOTA, A. C. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 9, p. 873–880, set. 2003.

MOURA, F. T. et al. Effects of a Chitin-Binding Vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* Seeds on Bean Bruchid Pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and Phytopathogenic Fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 260–266, jan. 2007.

MURDOCK, L. L. et al. Preservation of cowpea grain in sub-Saharan Africa—Bean/Cowpea CRSP contributions. **Field Crops Research**, v. 82, n. 2-3, p. 169–178, maio 2003.

OLIVEIRA, J. V. Ataque do *Callosobruchus* no feijão comercializado em Fortaleza-Ceará-

Brasil **B. Soc. Recr. Eng. Agrôn. Mossoró**, v. 2, p. 18-21, 1971.

ORRUÑO, E.; MORGAN, M. R. A. Purification and characterisation of the 7S globulin storage protein from sesame (*Sesamum indicum* L.). **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 926–934, jan. 2007.

PAES, E. V. et al. Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 129, n. 1, p. 11–17, out. 2008.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25 (13), p. 1605–1612, 2004.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95-99, 1963.

SALES, M. P. DE et al. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 27–34, 2001.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 779-815, 1993.

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

SHEWRY, P. R. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. **The Plant Cell Online**, v. 7, n. 7, p. 945–956, 1 jul. 1995.

SHUTOV, A. D.; KAKHOVSKAYA, I. A. Evolution of seed storage globulins and cupin superfamily. **Molecular Biology**, v. 45, n. 4, p. 529–535, 5 ago. 2011.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence

alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539–539, 16 abr. 2014.

SODING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W244–W248, 1 jul. 2005.

SOUZA, S. M. et al. The fate of vicilins, 7S storage globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1130–1138, set. 2010.

TAIWO, K. A. The potential of cowpea as human food in Nigeria. **Technovation**, v. 18, n. 6, p. 469–481, 1998.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 47–61, 2001.

UCHÔA, A. F. et al. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 169–178, fev. 2006.

WARNER, S. A. J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction. In:

Gary D. Foster and David Twell (ed) **Plant Gene Isolation**, John Wiley & Sons,

England, p. 56-58, 1996.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 1 maio 2009.

XAVIER-FILHO, J. The resistance of seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*) to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 86, p. 75-77, 1991.

XIE, Z.; NEIGEL, J.; CHLAN, C. Vicilin Genes of *Vigna luteola*: Structure, Organization, Expression, and Variation. **Biochemical Genetics**, v. 50, n. 5-6, p. 372–388, 9 dez. 2011.

ZHU, K.; HUESING, J. E.; SHADE, R. E.; MURDOCK, L. L. Cowpea trypsin inhibitor & resistance to cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) in cowpea variety “Tvu 2027”. Environ. Entomol. v. 23, p. 987-991, 1994.