

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

EDER ALMEIDA FREIRE

PROTEÍNAS INSETICIDAS DE *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*: EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA CV1887 EM *ESCHERICHIA COLI* E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE
CONTRA *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*

FORTALEZA
2007

EDER ALMEIDA FREIRE

PROTEÍNAS INSETICIDAS DE *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*: EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA CV1887 EM *ESCHERICHIA COLI* E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE
CONTRA *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

FORTALEZA
2007

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

-
- F933p Freire, Eder Almeida.
Proteínas inseticidas de *Chromobacterium violaceum*: expressão da proteína CV1887 em *Escherichia coli* e avaliação da sua atividade contra *Callosobruchus maculatus* / Eder Almeida Freire. – 2007.
139 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2007.
Area de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. Feijão-de-corda. 2. Expressão heteróloga. I. Título.

CDD 574.192

EDER ALMEIDA FREIRE

PROTEÍNAS INSETICIDAS DE *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*: EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA CV1887 EM *ESCHERICHIA COLI* E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE
CONTRA *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em 28 de maio de 2007

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dra. Cristina Paiva Silveira Carvalho
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dra. Djana Magalhães de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza-UNIFOR

“...transformaram-se em inimigos vorazes que possuíam a seu favor milhões de anos de evolução, durante os quais o poder de adaptar-se foi altamente desenvolvido [...] Estava, portanto, declarada uma verdadeira e interminável guerra.”

Fernando Mesquita Lara

A meu tio Antônio Almeida Sá (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a aptidão para a realização deste trabalho e a firmeza necessária para superar os momentos difíceis em minha jornada acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao Projeto.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela idealização do trabalho e orientação concedida com extrema dedicação, pela obstinação e esforço imensuráveis que proporcionaram a infra-estrutura para a realização deste trabalho e por todos os momentos de companheirismo e amizade propiciados durante anos de convívio.

À Professora Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães, a quem atribuo grande parte dos méritos deste trabalho, pela participação integral na realização dos experimentos e do trabalho escrito e constante demonstração de amizade.

Ao Professor Dr. Benildo de Sousa Cavada, responsável por minha iniciação científica, que me acolheu com uma paciência paternal, que acreditou no meu sucesso quando eu já não acreditava e que permitiu a recuperação de minha crença nos seres humanos.

À Professora da Universidade Federal de Campina Grande Josefa Elionita de Almeida Sá, minha Tia Nita, figura materna responsável pelo suporte intelectual que permitiu o meu ingresso na Universidade Federal do Ceará, por tudo aquilo que representa para a minha vida e pela inestimável contribuição para o trabalho escrito.

Ao meu tio Antônio Almeida Sá, a quem dedico este trabalho, e a Maria Estelina Ferreira Sá por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos e pela preciosa contribuição para a minha formação.

Às colegas do Laboratório de Genética Molecular Walderly Melgaço Bezerra, Nathália Dias de Oliveira, Camila Dias dos Santos e Marina Duarte Pinto Lobo, pela contribuição efetiva durante a execução dos experimentos e companheirismo demonstrado.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo estímulo intelectual e acesso aos equipamentos durante a execução dos experimentos.

Aos meus pais, irmãos e às “mães” Laura, Socorro e Vicentina, pelo afeto incondicional que não me permitiu fraquejar quando tudo parecia perdido.

A Naldinho, Isa, Jacqueline, Estrela, Suzana, Dinamite, Romário, Geovani, Joey, Edmundo, Mustaine, Kai, Gonzaga, Gordo, Redson, João, Harris, Raul, Dickinson, Elis e todos os demais, por contribuições pontuais e preciosas que foram extremamente importantes para o início, o meio e o fim deste trabalho.

À minha esposa e aos meus filhos, pelo suporte emocional propiciado durante o percurso da pós-graduação, por ter tolerado a minha ausência por tanto tempo e pela grata adição de amor e objetivo a minha vida.

RESUMO

A análise de genomas microbianos revela que os mesmos constituem recursos naturais promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos inovadores para a agricultura, na forma de novos genes para o controle de pragas e doenças. O presente trabalho objetiva avaliar a atividade inseticida de células e extratos celulares da bactéria *Chromobacterium violaceum*, e de *Escherichia coli* transformada com o gene CV1887 de *C. violaceum*, sobre larvas do bruchídeo *Callosobruchus maculatus* Fabr. Para conduzir a avaliação proposta, células íntegras e aquecidas a 100 °C por 30 minutos de *C. violaceum* foram incorporadas em sementes artificiais, testadas contra carunchos do Ceará e do Rio Grande do Norte, e o desempenho da progênie desses insetos foi avaliada em sementes de *Vigna unguiculata*. Células de *C. violaceum* foram lisadas e as frações obtidas foram testadas da mesma forma. Outra abordagem consistiu na transformação de células de *E. coli* com o plasmídeo pBAD-C, contendo o inserto CV1887, indução da expressão da proteína recombinante CV1887, incorporação das células induzidas em sementes artificiais e avaliação da toxicidade das sementes para *C. maculatus*. A toxicidade da violaceína extraída de *C. violaceum* também foi avaliada. As células de *C. violaceum* foram capazes de retardar o tempo de desenvolvimento de *C. maculatus* ($p < 0,05$), com um grau de toxicidade maior para os insetos do Rio Grande do Norte, em relação aos do Ceará. Nenhum efeito foi observado para o desempenho das progênies desses insetos. Quando as células de *C. violaceum* foram aquecidas a 100 °C por 30 minutos, a redução no tempo de desenvolvimento dos insetos foi acentuada ($p < 0,05$). A lise das células de *C. violaceum* revelou que a toxicidade de *C. violaceum* está dispersa no “extrato total solúvel”, no “extrato secretado” e no “extrato total insolúvel”, este último exibindo o maior efeito sobre os insetos testados ($p < 0,05$). Esse tratamento também indicou uma maior suscetibilidade para os insetos do Rio Grande do Norte submetidos às dietas com sementes artificiais enriquecidas com as diferentes frações de *C. violaceum*, mas não exibiu nenhum efeito sobre as progênies dos insetos de ambas as origens. A violaceína não foi tóxica para *C. maculatus*. A eficiência das etapas de extração do DNA de *C. violaceum*, amplificação e clonagem do gene CV1887 foi confirmada por meio de eletroforeses em géis de agarose. As concentrações de L-arabinose testadas para a indução da expressão da proteína CV1887 foram igualmente eficazes. As eletroforeses em SDS-PAGE não foram suficientes para detectar a proteína CV1887 no extrato total das células de *E. coli*. No entanto, quando a lise dessas células foi efetuada, uma proteína induzida com massa menor que a predita foi observada no “extrato total insolúvel”. As células de *E. coli* contendo o gene CV1887, cuja expressão foi induzida com L-arabinose, retardaram o tempo de desenvolvimento de *C. maculatus* ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que existem proteínas múltiplas envolvidas na toxicidade de *C. violaceum* para *C. maculatus*, e que o gene CV1887 pode estar envolvido no efeito inseticida observado para essa bactéria.

Palavras chave: Caruncho-do-feijão-de-corda. Feijão-de-corda. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

The analysis of microbial genomes reveals that they are natural promising resources to the development of some agricultural innovative biotechnological products, in the form of new genes, to control pests and diseases. Accordingly, this study aims to evaluate the insecticide activity of cells and cellular extracts of the bacterium *Chromobacterium violaceum* and *Escherichia coli* transformed with the gene CV1887 of *C. violaceum* on bruchid larvae of *Callosobruchus maculatus* Fabr. To conduct the proposed assessment, integrated and heated cells at 100° C during 30 minutes long, *C. violaceum* were incorporated into artificial seeds, tested in the combat against bruchid beetles originated in Ceará and from Rio Grande do Norte, and the performance of the progeny of these insects was evaluated in seeds of *Vigna unguiculata*. Cells of *C. violaceum* were lysed and the fractions obtained were tested in the same way. Another approach consisted in the transformation of cells of *E. coli* with the plasmid pBAD-C, containing the insert CV1887, induction of the recombinant protein expression CV1887, incorporation of induced seeds in artificial cells and evaluation of the toxicity of the seeds to *C. maculatus*. The toxicity of violacein extracted from *C. violaceum* was also evaluated. The cells of *C. violaceum* were able to delay the period of development of *C. maculatus* ($p < 0.05$), with a greater degree of toxicity to the insects originated in Rio Grande do Norte, in relation to those originated in Ceará. No effect was observed for the performance of the progenies of these insects. When cells of *C. violaceum* were heated to 100° C during 30 minutes long, the reduction in the period of development of the insects was significant ($p < 0.05$). The cells lysis of *C. violaceum* revealed that the toxicity of *C. violaceum* is dispersed in the “total soluble extract” in the “secreted extract” and in the “total insoluble extract”, the latter showing the greatest effect on the tested insects ($p < 0.05$). This treatment also indicated a higher susceptibility to insects from Rio Grande do Norte subjected to diets with artificial seeds enriched with different fractions of *C. violaceum*, but revealed no effect on the progenies of those from both origins. The violacein was not toxic to *C. maculatus*. The efficiency of the steps of extracting DNA from *C. violaceum*, amplification and cloning of the gene CV1887 was confirmed by agarose gels electrophoresis. The L-arabinose concentrations tested for the induction of protein expression CV 1887 were equally effective. The electrophoresis in SDS-PAGE were not sufficient to detect the protein CV1887 in total cell extract of *E. coli*. However, when these cells lysis was performed, an induced protein with a mass lower than the predicted one was observed in the “total insoluble extract”. The cells of *E. coli* containing the gene CV1887, whose expression was induced with L-arabinose, slowed the period of the development of *C. maculatus* ($P < 0.05$). The results suggest that there exist multiple proteins involved in the toxicity of *C. violaceum* to *C. maculatus*, and that the gene CV1887 might be involved in insecticide effects observed to this bacterium.

Keywords: Cowpea weevil. Cowpea. Heterologous Expression

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Sementes de <i>Vigna</i> infestadas com <i>C. maculatus</i>	23
FIGURA 2	- Representação dos estágios do desenvolvimento do “caruncho-do-feijão-de-corda” <i>Callosobruchus maculatus</i>	24
FIGURA 3	- Estágios do desenvolvimento de <i>Callosobruchus maculatus</i> Fabr.....	26
FIGURA 4	- Micrografia eletrônica de <i>Chromobacterium violaceum</i>	38
FIGURA 5	- Seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene CV1887.....	44
FIGURA 6	- Sementes artificiais utilizadas nos bioensaios com <i>C. maculatus</i>	49
FIGURA 7	- Células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	54
FIGURA 8	- Fração de células de <i>Chromobacterium violaceum</i> obtida após a lise celular.....	57
FIGURA 9	- Mapa circular e pontos de referência do vetor de clonagem <i>pGEM-T Easy Vector Multiple Cloning Sequences</i>	62
FIGURA 10	- Características do vetor de expressão <i>pBAD/Myc-His</i>	65
FIGURA 11	- Características do vetor de expressão <i>pBAD/Myc-His/lacZ</i>	68
FIGURA 12	- Tempo Médio de Desenvolvimento dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte, alimentados com dietas artificiais contendo células íntegras de <i>C. violaceum</i>	77
FIGURA 13	- Peso médio dos insetos recém-emergidos do Ceará e do Rio Grande do Norte, alimentados com dietas artificiais contendo células íntegras de <i>C. violaceum</i>	78
FIGURA 14	- Tempo médio de desenvolvimento dos insetos alimentados em dietas artificiais contendo células de <i>C. violaceum</i> aquecidas a 100 °C por 30 min.....	80
FIGURA 15	- Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Ceará alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido após a lise de células da <i>Chromobacterium violaceum</i>	82
FIGURA 16	- Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte alimentados em sementes artificiais com frações de <i>Chromobacterium violaceum</i>	83
FIGURA 17	- Comparação entre o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte. Insetos alimentados em dietas artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido após a lise de células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	85
FIGURA 18	- Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Ceará alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células da <i>Chromobacterium violaceum</i>	89
FIGURA 19	- Peso médio dos insetos do Ceará alimentados em sementes artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células da <i>Chromobacterium violaceum</i>	88
FIGURA 20	- Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte, alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células da <i>Chromobacterium violaceum</i>	89

FIGURA 21 - Comparação entre o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte. Insetos alimentados em dietas artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	91
FIGURA 22 - Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Ceará, alimentados com dietas artificiais, com frações obtidas após a lise de células de <i>C. violaceum</i> . A fração ETI destaca-se como a mais eficiente em retardar o tempo de desenvolvimento dos insetos.....	93
FIGURA 23 - Peso médio dos insetos do Ceará alimentados em sementes artificiais com frações de <i>Chromobacterium violaceum</i>	94
FIGURA 24 - Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido após a lise de células da <i>Chromobacterium violaceum</i>	95
FIGURA 25 - Peso médio dos insetos do Rio Grande do Norte, alimentados em dietas artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido após a lise das células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	97
FIGURA 26 - Percentual de eclosão de larvas dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte. A oviposição foi efetuada em sementes de <i>Vigna unguiculata</i> por insetos alimentados com dietas artificiais contendo frações obtidas após a lise de células de <i>C. violaceum</i> , na concentração de 1%.....	100
FIGURA 27 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos obtidos por meio da lise de células de <i>C. violaceum</i>	101
FIGURA 28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos obtidos após a lise de células de <i>C. violaceum</i> e do meio de cultura separado das células por centrifugação.....	103
FIGURA 29 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA genômico de <i>Chromobacterium violaceum</i>	104
FIGURA 30 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR, obtidos a partir do DNA genômico de <i>C. violaceum</i>	105
FIGURA 31 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pGEM-T <i>Easy</i> isolados de células <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	106
FIGURA 32 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR obtidos a partir dos plasmídeos pGEM-T <i>Easy</i> ::CV1887 isolados de células recombinantes de <i>E. coli</i> DH10B.....	107
FIGURA 33 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos dos plasmídeos pBAD-C::CV1887 isolados de células recombinantes de <i>E. coli</i>	109
FIGURA 34 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR dos plasmídeos pBAD-C::CV1887 isolados de células recombinantes de <i>Escherichia coli</i>	110
FIGURA 35 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras utilizadas como controle para as induções.....	111
FIGURA 36 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras de <i>E. coli</i> TOP10::CV1887, induzidas com diferentes concentrações de L-arabinose.....	112
FIGURA 37 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da Fração Insolúvel obtida após a lise das células de <i>E. coli</i> TOP10 utilizadas como controle ou contendo o gene CV1887, induzidas com diferentes concentrações de L-arabinose.....	114

- FIGURA 38 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da Fração Solúvel obtida após a lise das células de *E. coli* TOP10 utilizadas como controle ou contendo o inserto CV1887, induzidas com diferentes concentrações de L-arabinose..... 115
- FIGURA 39 - Tempo médio de desenvolvimento dos insetos alimentados com dietas artificiais contendo violaceína ou células de *E. coli* TOP10, transformadas com o plasmídio pBAD-C::CV1887..... 117
- FIGURA 40 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das células de *E. coli* TOP10, transformadas com o plasmídio pBAD-C::CV1887, utilizadas no Bioensaio IV..... 118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Organismos cujas proteínas apresentaram maiores similaridades com a proteína codificada pelo gene CV1887.....	73
TABELA 2 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará em dietas artificiais contendo células de <i>C. violaceum</i> íntegras.....	74
TABELA 3 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Número de Ovos por Fêmea dos insetos do Ceará criados em sementes de <i>V. unguiculata</i>	74
TABELA 4 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte em dietas contendo células íntegras de <i>Chromobacterium violaceum</i>	75
TABELA 5 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Número de Ovos por Fêmea dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes de <i>V. unguiculata</i>	75
TABELA 6 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados em sementes artificiais contendo células de <i>C. violaceum</i> íntegras.....	76
TABELA 7 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Número de Ovos por Fêmea dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte criados em sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	79
TABELA 8 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em dietas artificiais com células de <i>Chromobacterium violaceum</i> autoclavadas.....	79
TABELA 9 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido a partir da lise de células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	81
TABELA 10 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido a partir da lise de células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	81
TABELA 11 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido a partir da lise de células de <i>C. violaceum</i>	84
TABELA 12 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em sementes artificiais contendo o material secretado por células de <i>Chromobacterium violaceum</i> no meio de cultura.....	86
TABELA 13 - Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes artificiais contendo o material secretado por células de <i>Chromobacterium violaceum</i> no meio de cultura.....	86

TABELA 14 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o material secretado por células de <i>C. violaceum</i> no meio de cultura.....	90
TABELA 15 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido a partir da lise de células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	92
TABELA 16 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido a partir da lise de células de <i>Chromobacterium violaceum</i>	92
TABELA 17 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido a partir da lise de células de <i>C. violaceum</i>	96
TABELA 18 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência, Número de Ovos por Fêmea e Percentual de Eclosão de Larvas dos insetos do Ceará em sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	98
TABELA 19 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência, Número de Ovos por Fêmea e Percentual de Eclosão de Larvas dos insetos do Rio Grande do Norte em sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	98
TABELA 20 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência, Número de Ovos por Fêmea e Percentual de Eclosão de Larvas dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte em sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	99
TABELA 21 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos alimentados em sementes artificiais contendo violaceína.....	113
TABELA 22 -	Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos alimentados em sementes artificiais com células de <i>Escherichia coli</i> TOP10, contendo o gene CV1887.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

% EL	percentual de eclosão de larvas
% EM	percentual de emergência
°C	graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino-tetra-acético
ETI	extrato Total Insolúvel
ETS	extrato Total Solúvel
g	Gramas
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
IPTG	<i>isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i>
kDa	kilodaltons, 1000 Daltons
L	Litro
LB	meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
NaCl	cloreto de Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
NO/F	número de ovos por fêmea
OD ₆₀₀	densidade ótica a 600 nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i> . Fase Aberta de Leitura.
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- log (concentração de íons H ₃ O ⁺)

PM	peso médio dos insetos recém-emergidos
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SEC	extrato Secretado
spp.	Espécies
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão contendo Tris-HCl e EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TMD	tempo médio de desenvolvimento
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TVu 2027	cultivar de <i>Vigna unguiculata</i>
UV	Ultravioleta
X-Gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside</i>

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 O Caruncho do feijão de corda – <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius, 1792)....	22
3.1.1 Aspectos da Biologia.....	22
3.1.2 Manejo e Controle de <i>C. maculatus</i>	27
3.1.3 Proteínas tóxicas a <i>C. maculatus</i>	29
3.2 Bactérias envolvidas no controle biológico de insetos.....	30
3.3 O uso de plantas transgênicas no controle de pragas e doenças.....	32
3.4 Potencial biotecnológico de bactérias no controle de pragas e doenças.....	33
3.5 <i>Chromobacterium violaceum</i>.....	37
3.5.1 Generalidades.....	37
3.5.2 Potencial biotecnológico da <i>C. violaceum</i>	40
3.5.3 Proteínas com repetições YD.....	42
4 MATERIAIS.....	46
4.1 Espécimes de <i>Callosobruchus maculatus</i>.....	46
4.2 Plasmídeos e cepas bacterianas.....	46
4.3 Enzimas e demais reagentes.....	46
5. MÉTODOS.....	48
5.1 Avaliação da atividade inseticida de <i>C. violaceum</i> sobre larvas de <i>C. maculatus</i>.....	48
5.1.1 Criação dos insetos adultos de <i>C. maculatus</i>	48
5.1.2 Preparação das dietas artificiais.....	48
5.1.3 Delineamento Experimental.....	48
5.1.4 Bioensaio I.....	52
5.1.5 Bioensaio II.....	53
5.1.6 Bioensaio III.....	55
5.2 Clonagem do gene CV1887.....	56
5.2.1 Preparação dos meios de cultura.....	56
5.2.1.1 Meios Líquidos.....	56
5.2.1.2 Meio Contendo Agar.....	59
5.2.2 Preparação de células eletrocompetentes.....	59
5.2.3 Extração do DNA genômico de <i>Chromobacterium violaceum</i>	59
5.2.4 Amplificação do gene CV1887.....	60
5.2.5 Purificação dos produtos de PCR amplificados e ligação no vetor de clonagem.....	61
5.2.6 Extração do DNA plasmidial.....	63
5.2.7 Subclonagem do gene CV1887 para o vetor de expressão.....	64
5.2.8 Eletroforeses em gel de agarose.....	66
5.3 Indução de expressão da proteína recombinante codificada pelo gene CV1887.....	66

5.3.1 Indução das células de <i>E. coli</i> TOP10 utilizadas como controle.....	66
5.3.2 Determinação da concentração ideal de L-arabinose para a indução.....	67
5.3.3 Lise das células de <i>E. coli</i> induzidas.....	69
5.3.4 Eletroforeses de proteínas em gel de poliacrilamida.....	70
5.3.5 Bioensaio IV.....	72
6 RESULTADOS.....	73
6.1 Análise <i>in silico</i>.....	73
6.2 Avaliação da atividade inseticida de <i>C. violaceum</i> sobre larvas de <i>C. maculatus</i>.....	73
6.2.1 Bioensaio I.....	73
6.2.2 Bioensaio II.....	79
6.2.3 Bioensaio III.....	81
6.3 Clonagem do gene CV1887.....	102
6.3.1 Extração do DNA genômico de <i>Chromobacterium violaceum</i>	102
6.3.2 Amplificação do gene CV1887.....	102
6.3.3 Ligação dos insertos no vetor de clonagem pGEM-T <i>Easy</i>	102
6.3.4 Ligação dos insertos no vetor de expressão pBAD-C <i>Myc-His</i>	108
6.4 Indução de expressão da proteína recombinante codificada pelo gene CV1887.....	108
6.4.1 Indução das células de <i>E. coli</i> TOP10 utilizadas como controle.....	108
6.4.2 Determinação da concentração ideal de L-arabinose para a indução.....	108
6.4.3 Lise das células de <i>E. coli</i> TOP10 contendo o inserto CV1887 e dos controles.....	113
6.4.4 Bioensaio IV.....	113
7 DISCUSSÃO.....	119
8 CONCLUSÃO.....	125
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a população mundial em 2003 foi estimada em cerca de 6,3 bilhões de habitantes (<http://apps.fao.org>) e a projeção para 2025 é de aproximadamente 7,8 bilhões. Esse aumento, que deverá ocorrer, principalmente, nos países em desenvolvimento, irá requerer uma produção agrícola adicional de cerca de 2 bilhões de toneladas por ano. Entretanto, esse adicional na produção agrícola não deve depender de um aumento na área agricultável, mas sim, do incremento da produtividade agrícola. Isso pode ser alcançado, pelo menos em parte, por um controle mais eficiente nas perdas devidas a agentes bióticos – pragas, doenças e ervas daninhas – (AGRIOS, 1997). Nos países em desenvolvimento, as perdas de alimento podem alcançar 20 – 40% da produção potencial, em consequência das pragas e doenças (KADER, 2005).

Os métodos de controle, atualmente empregados, ainda dependem, basicamente, do uso de defensivos agrícolas dentro de um manejo integrado de pragas. Entretanto, existe uma demanda crescente, por parte da sociedade, pelo desenvolvimento de uma agricultura limpa, que diminua o uso de energia e produtos químicos, que reduza o acúmulo de resíduos indesejáveis no meio ambiente e nos alimentos e que diminua o risco de contaminações pelos agricultores. Entre as alternativas para contornar estes problemas estão o controle biológico e o uso de variedades resistentes.

O surgimento de técnicas de biologia molecular que permitem a manipulação de genes de interesse, aliado às metodologias de cultura de tecidos e transformação genética de plantas, destaca-se como uma abordagem alternativa no controle de pragas e doenças. Deste modo, genes que codificam proteínas que interferem com o crescimento e desenvolvimento de insetos, nematóides, fungos e bactérias, podem ser introduzidos nas culturas de interesse para reduzir sua susceptibilidade a pragas e doenças. De fato, desde o início da sua comercialização há dez anos, culturas transgênicas contendo características agronômicas desejáveis têm sido introduzidas em diferentes mercados agrícolas economicamente importantes, e hoje já são cultivadas em 385 milhões de hectares em todo o mundo (CASTLE; Mc ELROY, 2006). Nesse contexto, a análise de genomas microbianos tem revelado que os mesmos constituem recursos naturais promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos inovadores para a agricultura, na forma de novos genes para o controle de pragas e doenças (VODOVAR *et al.*, 2006; FFRENCH-CONSTANT; WATERFIELD, 2005; DUCHAUD *et al.*, 2003).

No cenário atual, todas as variedades transgênicas disponíveis comercialmente utilizam os genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* como agentes inseticidas, o que desperta a preocupação da comunidade científica com o surgimento de insetos resistentes às toxinas dessas bactérias. Portanto, um desafio central a ser enfrentado pelo biotecnologista é a identificação de novos genes que irão produzir produtos inseticidas, nematicidas e fungicidas, com características adequadas para a geração de culturas transgênicas. Nesse sentido, as bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila*, que vivem em associação mutualística com nematóides entomopatogênicos das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, vêm sendo intensivamente estudadas, como alternativas em potencial ao *B. thuringiensis* (MOAR, 2003). Mais recentemente, numa tentativa de se descobrir outras bactérias com propriedades semelhantes à *Photorhabdus*, Martin *et al.* (2004) relataram a recuperação de um isolado do solo, identificado como *Chromobacterium* sp., e a mesma apresentou toxicidade ao coleóptero *Leptinotarsa decemlineata*, o “escaravelho da batateira”, importante praga de culturas olerícolas.

Chromobacterium violaceum é uma bactéria de vida livre Gram-negativa, saprófita, não-patogênica e aeróbica facultativa, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes. Essa bactéria está presente em grande quantidade nas águas do Rio Negro, na Amazônia. Ocasionalmente, pode atuar como um patógeno oportunista em animais e homens, causando septicemia fatal, a partir de lesões na pele, produzindo abscessos no fígado e pulmão (DURÁN *et al.*, 2001). A identificação de ORFs de *C. violaceum* que apresentam similaridade com genes codificadores de proteínas inseticidas de *Xenorhabdus* spp. e *P. luminescens* pode ser um indicativo do potencial dessa bactéria no controle de insetos (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Nos países em desenvolvimento como o Brasil, o consumo de proteínas de origem vegetal chega a 78,8%, tornando-se fonte principal ou, em alguns casos, fonte suplementar das proteínas da dieta (SINGH; SINGH, 1992). Na região Nordeste do Brasil, o consumo do feijão-de-corda ou caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) nas áreas urbanas não metropolitanas corresponde a 41% dos feijões em geral, enquanto nas áreas rurais, onde a qualidade do feijão é melhor, a proporção sobe para 57%. A quantidade de feijão consumida por populações rurais representa mais do que o dobro de algumas áreas urbanas. Em 2007, a produção de feijão-de-corda da região Nordeste foi estimada em 3,6 milhões de toneladas. O Estado do Ceará destacou-se como o maior produtor de feijão-de-corda da região Nordeste, contribuindo com 124,6 toneladas (IBGE, 2007).

Os insetos ocupam uma posição de destaque no cultivo do feijão-de-corda, visto que uma série deles pode comprometer o processo produtivo alimentando-se da planta em diferentes órgãos e estádios fenológicos, o que acarreta danos irreversíveis, e muitas vezes, perdas alarmantes na produção. Após a colheita, os grãos de *V. unguiculata* ainda não se encontram livres dos insetos. As pragas dos grãos armazenados constituem um dos problemas mais sérios para aqueles que cultivam o feijão-de-corda, especialmente o “caruncho do feijão” (*Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) – Coleoptera: Bruchidae). As larvas de *C. maculatus* desenvolvem-se no interior dos grãos, depreciando o valor comercial do produto, bem como o poder germinativo das sementes (SANTOS, 1971).

Ainda que o combate ao caruncho *C. maculatus*, seja alvo de intensas investigações realizadas por várias instituições mundiais, o inseto persiste como um dos maiores entraves para a produção do feijão-de-corda. Por isso, a busca contínua por alternativas ao uso dos defensivos químicos usualmente aplicados nas grandes produções de *V. unguiculata* é de fundamental importância para a Região Nordeste, a qual se destaca na produção do feijão-de-corda e está inserida em uma das principais regiões produtoras do feijão-de-corda. De acordo com resultados obtidos pelo sequenciamento do genoma dessa bactéria, descobriu-se que uma proteína codificada pelo gene CV1887 da *C. violaceum* apresenta similaridade com a proteína nematocida de *X. nematophilus* e com proteínas inseticidas de *P. luminescens*, dois microrganismos que têm propriedades inseticidas já comprovadas experimentalmente (VASCONCELOS *et al.*, 2003). É nesse contexto que investigamos o potencial biotecnológico da bactéria *C. violaceum* no combate ao *C. maculatus*, focalizando o gene CV1887, cuja ORF codifica proteínas com o maior número de repetições YD – cada seqüência consenso, contendo as repetições YD tem um comprimento de cerca de 20 aminoácidos. A seqüência consenso é **Gx3-9YxYDx2GR(L, I ou V)x3-10G**, onde **x** representa qualquer aminoácido (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000) e esses motivos estão presentes em proteínas dos complexos de toxinas de bactérias como *P. luminescens* e *X. nematophilus* – dentre outros, encontrados no genoma de *C. violaceum* (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade inseticida de células e frações celulares de *Chromobacterium violaceum* e de *Escherichia coli* transformada com o gene CV1887 de *C. violaceum*, em larvas de *Callosobruchus maculatus*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade inseticida das células de *C. violaceum* ou dos extratos obtidos a partir da lise de células da bactéria contra carunchos provenientes do Ceará e do Rio Grande do Norte;
- Avaliar o efeito das células ou dos extratos celulares de *C. violaceum* contendo o material testado contra a progênie dos insetos criados em sementes artificiais;
- Amplificar e clonar o gene CV1887 no vetor pGEM-T *easy*;
- Clonar o gene CV1887 no vetor de expressão pBAD-C;
- Transformar células de *E. coli* com o plasmídeo pBAD-C, contendo o inserto CV1887;
- Induzir a expressão da proteína recombinante CV1887 em células de *E. coli* transformadas.
- Contribuir para o conhecimento científico, no que diz respeito à natureza e ao mecanismo de ação das proteínas de bactérias com motivos contendo repetições YD.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Caruncho do feijão de corda – *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1792)

De acordo com Southgate *et al* (1957) e Carvalho e Machado (1967), a espécie *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1792) ocupa a seguinte posição taxonômica: Classe Insecta, Ordem Coleoptera, Subordem Polyphaga, Superfamília Chrysomeloidea, Família Bruchidae, Gênero *Callosobruchus* e Espécie *C. maculatus*.

O “caruncho do feijão” constitui uma importante praga do gênero *Vigna*, e ocasionalmente ataca outras sementes de Phaseoleae, como *Glycine max* (soja). No entanto, este inseto se destaca como a principal praga do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) durante o período de armazenamento das sementes (SANTOS; QUINDERÉ, 1988). Segundo Gallo *et al.* (1998), “o caruncho apresenta infestação cruzada, iniciando sua infestação no campo, onde oviposita nas vagens deiscentes ou defeituosas”. Durante um curto período de estocagem, as larvas de *C. maculatus* podem reduzir o valor comercial do produto destinado à alimentação humana em até 50%, em virtude da presença de insetos mortos, ovos e excrementos resultantes do hábito alimentar das larvas (OLIVEIRA, 1971; BASTOS 1973), transmite um sabor desagradável e mau aspecto comercial às sementes (Figura 1). Os danos causados por esta espécie são um problema mundial, chegando a provocar perdas superiores a 30%, ao final de seis meses de armazenamento (SINGH; ALLEN, 1980).

No caso de sementes para o plantio, o poder germinativo é muito afetado pelo inseto. Santos e Vieira (1971) compararam o poder germinativo de sementes sadias com o de sementes atacadas, e constataram que há uma redução média, provocada pelo caruncho, de 18,3% para sementes com um furo; de 51,7%, para sementes com dois furos; de 66,7%, para sementes com três furos; e, praticamente, 100% para sementes com quatro furos.

3.1.1 Aspectos da Biologia

Segundo Bastos (1988), o caruncho *C. maculatus* é descrito em sua biologia da seguinte forma: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2).



FIGURA 1 – Sementes de *Vigna* infestadas com *C. maculatus*. **a.** Semente de *Vigna radiata*. A seta indica 4 ovos com a coloração branca que indica a eclosão das larvas no tegumento da semente. **b.** Semente de *Vigna unguiculata*, com destaque para a emergência de um inseto adulto. **c.** Nesta e nas demais sementes de *V. unguiculata* podemos observar um grande número de ovos após a eclosão das larvas e as galerias que depreciam o valor comercial do produto. Fonte: www.springhalen.dk/foderdyr_salg.htm (19/04/2007).

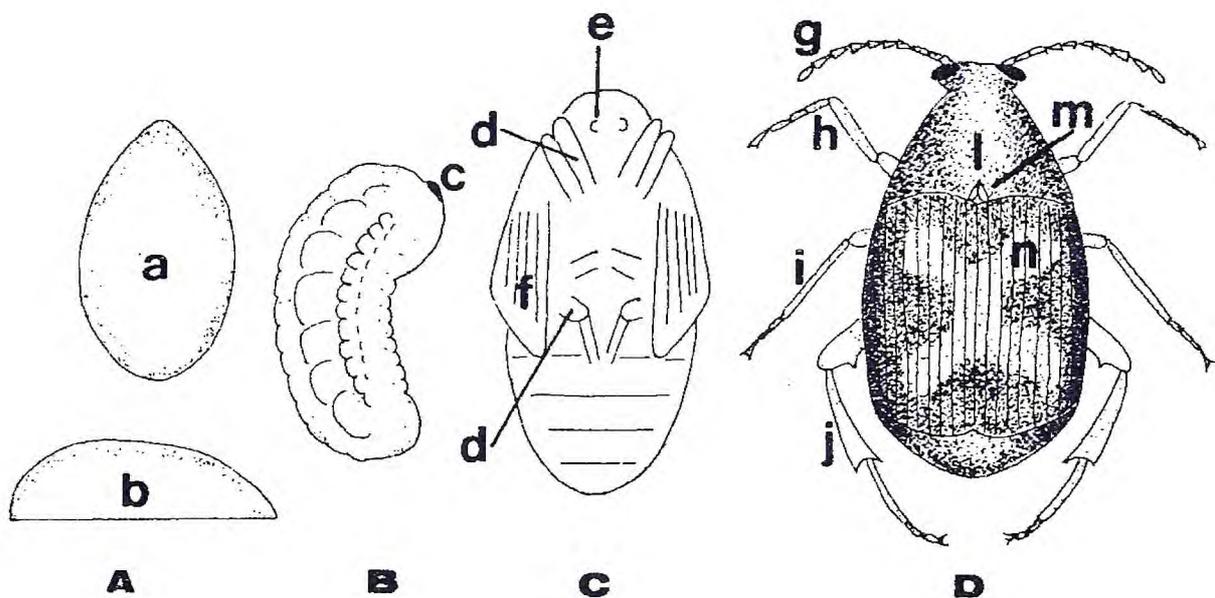


FIGURA 2 – Representação dos estágios do desenvolvimento do “caruncho do feijão-de-corda”, *Callosobruchus maculatus* (Fabr.). **A**- Ovo; **B**- Larva; **C**- Pupa; **D**- Adulto. **a**- Ovo visto por cima; **b**- Vista lateral do ovo; **c**- Cabeça da larva; **d**- Vestígios das patas; **e**- Vestígios dos olhos; **f**- Vestígios das asas; **g**- Antena; **h**- Pata anterior; **i**- Pata mediana; **j**- Pata posterior; **l**- Pronoto; **m**- Manchas das partes posteriores do pronoto; **n**- Élitros. Imagem: BASTOS (1988), pg. 150.

O ovo apresenta uma coloração branca, forma subelítica, com um dos pólos arredondado e o outro afilado; comprimento próximo de 0,5 mm e largura próxima de 0,3 mm. O ovo se fixa fortemente no feijão. Os ovos dos quais as larvas já eclodiram são facilmente diferenciados dos demais (Figura 3), pois apresentam a coloração branca das partes consumidas pelas larvas durante a eclosão e penetração nas sementes (SANTOS, 1971).

A larva apresenta cor branca, forma curva, com cabeça marrom. Quando se desenvolve apresenta um comprimento aproximado de 3,0 mm (Figura 3). A pupa apresenta cor branca, com vestígios de asas, patas e olhos. Pouco antes de emergir na forma adulta assume a cor marrom. Possui um comprimento aproximado de 4,0 mm. O adulto tem um comprimento aproximado de 2,5 a 3,0 mm, cabeça preta, desordenadamente pontuada, antena com 11 segmentos, ligeiramente serreada do 5º ao 10º segmento. Apresenta o tórax preto, irregularmente punctuado e com pubescência dourada. A parte posterior do pronoto apresenta duas manchas formadas de pubescência de mesma cor. Cada élitro apresenta três manchas pretas: uma pequena na parte anterior, uma grande na parte mediana e outra na posterior. O restante do élitro é de cor marrom. Os dois élitros vistos conjuntamente formam uma mancha em forma de X, de cor marrom (Figura 3). O fêmur da pata posterior traz um dente agudo e ereto. Patas anteriores e medianas são semelhantes (SANTOS, 1971).

Howe e Currie (1964) definiram os seguintes valores dos limites físicos, relativos à temperatura, para o desenvolvimento e postura de *C. maculatus* em sementes de caupi: limite inferior, 19,5 °C; limite superior, 36 °C; máxima sobrevivência, 25 °C; postura máxima, 35 °C.

As condições ideais para postura máxima são obtidas a 35 °C e 70% de umidade relativa, quando em média, as fêmeas ovipositam 97,2 ovos, em uma amplitude de 71 a 117 ovos. O pico de oviposição ocorre durante o primeiro dia de postura. Nessas condições, os adultos vivem, em média, 10,4 dias, com amplitude de 8 a 16 dias. Acima e abaixo dessas condições, a postura média e a vida adulta são afetadas, isto é, acima de 35 °C a postura e a vida dos adultos decrescem; abaixo disto a postura diminui e a vida do adulto aumenta (SANTOS; QUINDERÉ, 1988).

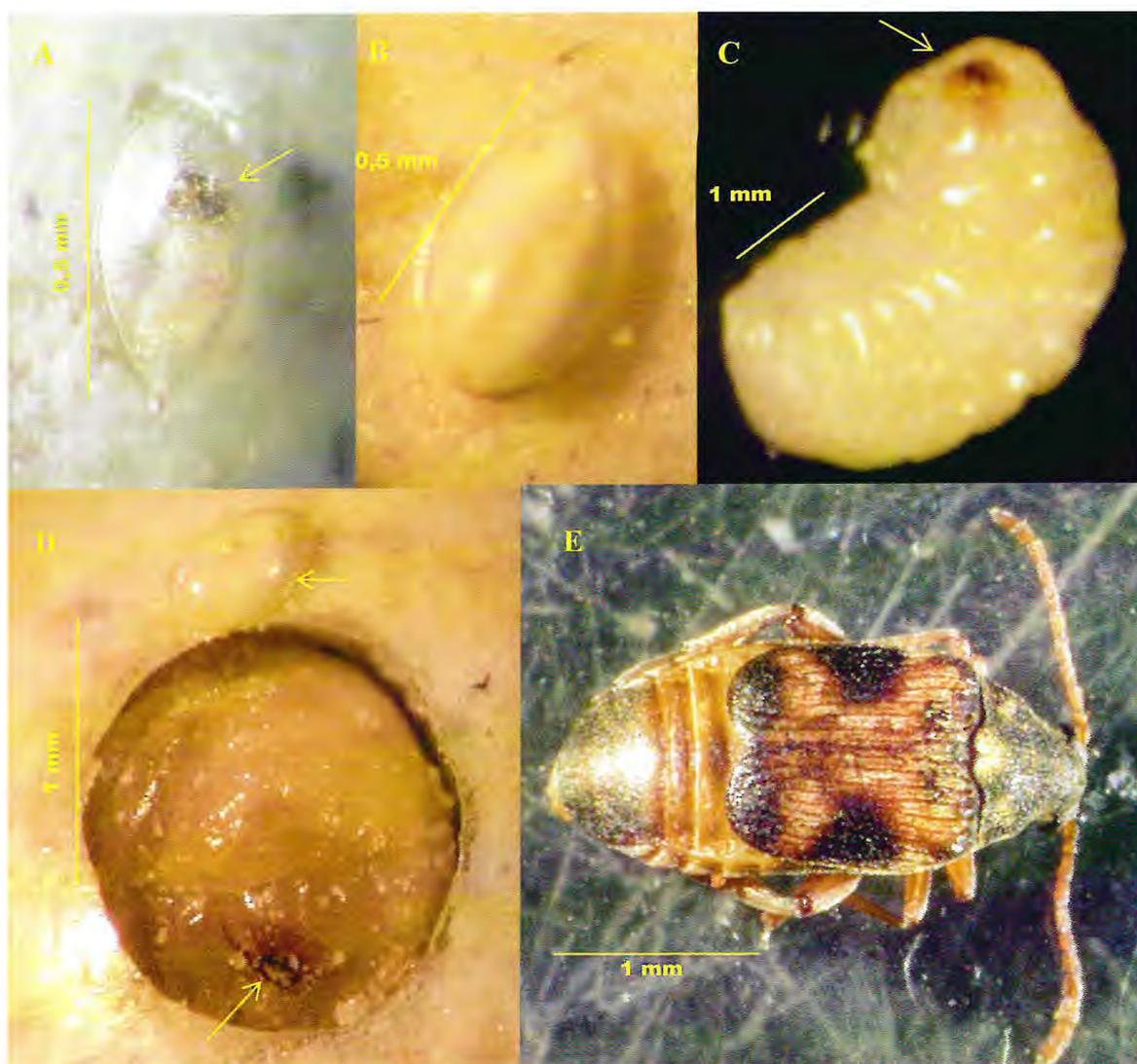


FIGURA 3. Estágios do desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.). **A.** Ovo contendo a larva do 1^o instar. A seta indica a cabeça da larva. O corpo estende-se verticalmente para baixo. **B.** Ovo após a eclosão da larva. A coloração evidenciada é devida às partes da semente e do tegumento consumidas pela larva durante a penetração na semente. **C.** Larva do 4^o instar de *C. maculatus*. A seta indica a cabeça. **D.** Ovo após a eclosão e larva do 4^o instar no interior da galeria formada como consequência de sua alimentação na semente. A seta superior indica o ovo e seta inferior indica a cabeça da larva. O corpo da larva preenche toda a galeria. **E.** Adulto de *C. maculatus*. Foto: Nathália Dias de Oliveira (UFC).

3.1.2 Manejo e Controle de *C. maculatus*

À medida que a praga avançou os agricultores testaram estratégias para combater *C. maculatus*, e algumas práticas alternativas de manejo foram assimiladas, permitindo o armazenamento de quantidades suficientes para o consumo familiar por alguns meses. Dentre estas práticas, o armazenamento de grãos ou sementes de caupi em depósitos hermeticamente fechados e em recipientes semi-herméticos, tais como depósitos de tijolos e argamassa ou caixas de amianto, cobertos de areia, não permite o desenvolvimento deste inseto. Alguns agricultores nordestinos costumam misturar o feijão com areia de rio. Este processo não evita o desenvolvimento do ovo já depositado no grão, mas evita novas posturas, e só funciona quando o feijão for intercalado em pequenas camadas com a areia, ou misturado com ela (CAJAZEIRAS, 2000). No entanto, essas práticas são inviáveis para o armazenamento de grandes quantidades de grãos, durante o período de entressafra, sem que ocorra uma depreciação do produto por outros fatores.

Silva e Carneiro (2000) recomendam a adoção do seguinte esquema para o controle de *C. maculatus* nos grãos armazenados em sacarias: a) no período da entressafra, os armazéns devem ser limpos e desinfestados, com aplicação de inseticidas, por meio de pulverização, polvilhamento ou nebulização, procurando atingir principalmente os locais de esconderijo dos insetos, como cantos de paredes, fendas dos trados, rachaduras de pisos e paredes, locais escuros, etc.; b) realização de expurgo em todo o material a ser estocado e, posteriormente, pulverização ou polvilhamento das superfícies do material expurgado; c) monitoramento dos grãos armazenados, fazendo mensalmente uma amostragem de cada lote e expurgando novamente aqueles infestados. Na operação de expurgo são empregados defensivos conhecidos como fumigantes, sendo o fosfeto de alumínio (fosfina) o mais utilizado atualmente. Estes inseticidas são tóxicos para mamíferos e deixam resíduos, o que torna perigosa a sua aplicação sem a devida assistência técnica.

O emprego de substâncias de origem vegetal contra *C. maculatus*, inclusive óleos essenciais, já foi estudado (OLIVEIRA, *et al.*, 1984) e pode consistir uma boa alternativa para o controle deste inseto. Existem vários relatos de atividade inseticida com tais substâncias. Brito *et al.* (2006) descreveram a toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. em *C. maculatus*; Kéita *et al.* (2001) constataram a eficácia dos óleos essenciais de *Ocimum* spp. no controle deste inseto; Lale e Abdulrahman (1999) relataram o efeito detrimental de extratos de *Azadirachta indica* A. Juss sobre adultos e larvas de *C. maculatus*; e

Braga *et al.* (2007) identificaram a atividade ovicida da 2-tridecanona, o principal componente do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*.

O melhoramento genético é uma ferramenta valiosa no combate aos insetos, a partir da obtenção de cultivares, combinando resistência a pragas com outros caracteres de interesse agrônômico. Embora uma série de cultivares de caupi tenha sido lançada no mercado por diferentes instituições, desde o início dos programas de melhoramento genético da espécie, a resistência varietal a insetos é escassa. Existe a disponibilidade de cultivares de caupi com excelentes índices de produtividade, arquitetura da planta desejável e resistência (às vezes múltipla) a viroses. Essas cultivares, no entanto, são susceptíveis ao ataque predatório de insetos e é praticamente inviável cultivá-las sem o controle desses organismos, muitas vezes fundamentado em práticas danosas ao ambiente e onerosas para os produtores.

Segundo Lara (1991), a resistência é um caráter genético, utilizado pela planta para resistir ao ataque de insetos, que são diretamente afetados por meio de alterações no seu comportamento ou na sua biologia. Atente-se que o comportamento de uma planta pode variar frente ao ataque de diferentes raças, ou biótipos, de uma espécie de inseto. Painter (1968) propõe a classificação da resistência de plantas a insetos em três tipos: a) não-preferência (termo modificado para antixenose por Kogan e Ortman, em 1978) para alimentação, oviposição ou abrigo; b) tolerância, que consiste na regeneração ou capacidade da planta de suportar o ataque do inseto; c) antibiose, quando a planta exerce um efeito adverso sobre a biologia do inseto, causando mortalidade das formas jovens, mortalidade na transformação para adultos, redução do tamanho e peso dos indivíduos, redução da fecundidade, alteração da proporção sexual e alteração no tempo de vida do inseto.

A resistência de cultivares de caupi pode ser suplantada por biótipos de *C. maculatus*, capazes de alterar a relação planta – inseto. Ainda que a utilização da planta pela praga se mantenha em níveis baixos por várias gerações, a intensidade da pressão seletiva produziria uma população de insetos adaptados [...] A mudança da resposta de *C. maculatus* ao cultivar resistente TVu 2027 foi demonstrada [...] em três gerações de biótipos do Yemen e da Nigéria, onde o desenvolvimento dos insetos ocorreu rapidamente, levando a uma evolução da população capaz de sobreviver neste cultivar (LIMA *et al.*, 2001, p. 276).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de identificar genótipos de *V. unguiculata* resistentes a *C. maculatus* (OSUJI, 1976; FATUNLA; BADARU, 1983; KITCH *et al.*, 1991; MBATA, 1993; EDDE; AMATOBI, 2000; BARRETO; QUINDERÉ, 2000). Conseqüentemente, vários genótipos de caupi são relatados como resistentes ao caruncho. No entanto, os “frutos” destes esforços ainda não são visíveis no mercado, visto que estes materiais, em sua grande maioria, não reúnem as características necessárias para uma

boa aceitação comercial. A maioria das cultivares recomendadas para a Região Nordeste por Freire-Filho *et al.* (1987) mostrou-se susceptível a *C. maculatus* (CAJAZEIRAS, 2000).

3.1.3 Proteínas tóxicas a *C. maculatus*

A constatação da presença de inibidores de tripsina em sementes de caupi (BOLCHERS *et al.*, 1947) despertou o interesse dos pesquisadores no envolvimento de componentes protéicos na resistência de cultivares a insetos. No fim dos anos 70, surgiram os primeiros resultados sugerindo que inibidores de tripsina estariam envolvidos na resistência da cultivar de caupi TVu 2027 a *C. maculatus* (GATEHOUSE *et al.*, 1979). No entanto, essa hipótese não foi confirmada por outros autores (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989; ZHU *et al.*, 1994). Murdock *et al.* (1990) observaram que o inibidor de proteinases cisteínicas E-64 é detrimental ao desenvolvimento de *C. maculatus* em dietas artificiais. Anos depois, Silva *et al.* (2001) demonstraram que a maior parte da atividade proteolítica do intestino de larvas de *C. maculatus* é devida a proteinases cisteínicas. Deste modo, inibidores de tripsina seriam ineficazes contra o caruncho *C. maculatus*.

O foco na digestão de proteínas como um alvo para o controle de bruchídeos mudou para a digestão de amido, como uma consequência de resultados demonstrando que inibidores de α -amilase de sementes de *Phaseolus vulgaris* são prejudiciais ao desenvolvimento de *C. maculatus* e *C. chinensis* (ISHIMOTO; KITAMURA, 1989), a despeito de sugestões prévias de que lectinas de sementes de *P. vulgaris* eram o fator ativo contra *C. maculatus* (JANZEN *et al.*, 1976; GATEHOUSE *et al.*, 1984). Nos anos 90, foi definitivamente demonstrado que um inibidor de α -amilase, e não a lectina, é o fator envolvido na antibiose de *P. vulgaris* a *C. maculatus* (HUESING *et al.*, 1991), mas a resistência de genótipos de *V. unguiculata* ao caruncho pode não estar relacionada com a presença de inibidores de α -amilase, que aparecem em baixos níveis em genótipos com diferentes graus de resistência (REIS *et al.*, 1997).

A toxicidade de lectinas de outras espécies a *C. maculatus*, no entanto, é relatada. Em um levantamento, utilizando dezessete lectinas vegetais com especificidade por diferentes monossacarídeos, Murdock *et al.* (1990) identificaram cinco lectinas (3 lectinas específicas para GlcNAc e 2 específicas para GalNAc/Gal), que causaram um retardamento significativo no tempo de desenvolvimento larval de *C. maculatus*. Do grupo das lectinas ligantes a GalNAc/Gal, as mais tóxicas foram as de *Arachis hypogea* (amendoim) e *Maclura pomifera*. Todas as lectinas ligantes a GlcNAc testadas foram prejudiciais ao desenvolvimento larval de

C. maculatus, sendo a lectina de germe de trigo (*Triticum aestivum*), a WGA, a mais deletéria. As três isolectinas do trigo, quando incorporadas separadamente em sementes artificiais, foram igualmente efetivas em retardar o crescimento e desenvolvimento do caruncho-do-feijão-de-corda (HUESING *et al.*, 1991).

As proteínas de armazenamento de sementes, em sua maioria, são conhecidas como globulinas, que são insolúveis em água e estão tipicamente presentes em sementes de leguminosas. Prolaminas e glutelinas, solúveis em álcool e álcali, respectivamente, são encontradas principalmente em sementes de cereais. Análises das frações protéicas de sementes de caupi indicaram que os efeitos detrimenais sobre o desenvolvimento de *C. maculatus* estão associados à fração globulínica (MACEDO *et al.*, 1993). Firmino *et al.* (1996) relataram que vicilinas de legumes, também conhecidas como globulinas de estoque 7S, são capazes de ligar-se a várias estruturas contendo quitina, dentre elas, as do intestino médio de bruchídeos. Em outro trabalho, vicilinas isoladas de sementes de caupi resistentes a *C. maculatus* (TVu 2027) mostraram-se detrimenais ao desenvolvimento de larvas deste inseto, ao contrário daquelas isoladas de sementes suscetíveis (YUNES *et al.*, 1998). Em estudos imunohistoquímicos, Xavier-Filho *et al.* (2000) encontraram vicilinas variantes ligadas a estruturas quitinosas do intestino médio das larvas de *C. maculatus*. Os autores sugerem que a resistência de alguns genótipos de caupi ao caruncho pode ser induzida pelas baixas taxas de hidrólise das vicilinas variantes obtidas de sementes resistentes no intestino médio dos insetos. Por outro lado, as vicilinas variantes dessas sementes exibem uma alta afinidade por quitina, quando comparadas com as vicilinas de sementes susceptíveis.

3.2 Bactérias envolvidas no controle biológico de insetos

As bactérias entomopatogênicas Gram-positivas se destacam no controle de insetos predadores de plantas e vetores de doenças humanas. Desde a descoberta do primeiro patógeno desse tipo, *B. thuringiensis* (*Bt*), bactérias de outras espécies foram identificadas no combate aos insetos. Segundo Ensign *et al.* (1997) *B. thuringiensis* (*Bt*) é um agente inseticida eficaz, e é amplamente usado comercialmente como tal. De fato, o agente inseticida da bactéria *Bt* pode ser usado em alimentos no dia da colheita, por tratar-se de uma proteína que tem toxicidade limitada. Nos organismos que não são alvos, a toxina *Bt* é uma proteína atóxica digerível. O *spray* de *B. thuringiensis* tem uma longa história de uso para o controle de pragas agrícolas, e mais recentemente, *sprays* de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) e de *Bacillus sphaericus* (*Bsp*) foram usados para controlar mosquitos transmissores de

doenças, dentre eles os “borrachudos”, do gênero *Simulium* (MAAGD *et al.*, 2003). As bactérias desse gênero formam endósporos sob condições adversas e, concomitantemente, formam inclusões cristalinas contendo uma ou mais proteínas inseticidas. Estas proteínas, quando ingeridas, são tóxicas para insetos, usualmente atuando nas células epiteliais do intestino desses organismos. *B. sphaericus* (*Bsp*) formam esporos esféricos com cristais tóxicos para larvas de dípteros. Algumas estirpes produzem proteínas solúveis com atividade contra dípteros (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 2000). *Penibacillus larvae* é um importante patógeno de larvas da abelha *Apis mellifera*, enquanto as bactérias *Brevibacillus laterosporus* e *Clostridium bifermentans* são tóxicas para larvas de dípteros (MAAGD *et al.*, 2003).

Segundo Martin (2004), *Bacillus popilliae* Dutky foi o primeiro pesticida de origem bacteriana a controlar, com sucesso, insetos da ordem Coleóptera, exibindo atividade inseticida contra o “besouro japonês” *Popillia japonica* (DUTKY, 1940). Outras bactérias são promissoras no controle de besouros, mas não têm conseguido sucesso comercial. Várias estirpes de *B. thuringiensis* são tóxicas para besouros escarabídeos (OHBA *et al.* 1992) e *Diabrotica* spp. (TAILOR *et al.* 1992). *Serratia entomophila* (GRIMONT; GRIMONT, 1978) e *Serratia proteamaculans* causam a doença “âmbar” no escarabídeo *Costelytra zealandica* e estão sendo desenvolvidas na Nova Zelândia (JACKSON *et al.* 1993). *Spiroplasma leptinotarsae* tem sido implicada como um agente causador de doença no besouro colorado da batata (HACKETT *et al.* 1996), mas outras poucas bactérias têm sido usadas para controlar efetivamente essa praga (ONSTAD, 2001). O besouro Colorado da batata *Leptinotarsa decemlineata* (Say) é uma das principais pragas da batata, tomate e berinjela. *B. thuringiensis* Berliner pode controlar com sucesso esta peste como um *spray* foliar (FERRO *et al.* 1997) ou em plantas transgênicas expressando o gene *cry* (PERLAK *et al.* 1993).

Outras bactérias estão envolvidas, indiretamente, no controle biológico, associadas a certos gêneros de nematóides, conhecidos como vetores de transmissão de simbiontes bacterianos entomopatogênicos. Espécies de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) vivem em associação mutualística com nematóides das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, respectivamente, ocupando o intestino dos vermes. Os nematóides contendo bactérias inseticidas invadem as larvas dos insetos. As bactérias se multiplicam na hemolinfa das larvas, produzindo substâncias tóxicas, causando septicemia e ocasionando a morte das larvas. Os nematóides se reproduzem e a progênie se alimenta no interior dos cadáveres, invadindo posteriormente larvas adicionais (ARONSON *et al.*, 1986;

KAYA; GAUGLER, 1998). Embora esses nematóides atuem como agentes inseticidas eficazes, a produção, manutenção e distribuição desses organismos para o controle de insetos são laboriosas, onerosas e ineficientes.

3.3 O uso de plantas transgênicas no controle de pragas e doenças

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transformação genética de plantas, tem possibilitado uma abordagem alternativa no controle de pragas e doenças. Genes que codificam proteínas que interferem com o crescimento e desenvolvimento de insetos, nematóides e fungos, podem ser introduzidos nas culturas de interesse, via engenharia genética, para reduzir sua suscetibilidade a pragas e doenças. A introdução comercial, em meados da década de 1990, de variedades de milho, batata e algodão geneticamente modificadas com genes codificando uma δ -endotoxina de *B. thuringiensis* (*Bt*), representou um dos sucessos concretos dessa nova abordagem do melhoramento genético.

Considerando que já havia suficiente experiência acumulada sobre o comportamento de alguns vegetais geneticamente modificados, agências reguladoras de alguns países liberam algumas plantas transgênicas para o plantio e comércio, a começar pela China, que libera um tabaco resistente a vírus, em 1990, seguido pelo tomate Flav Savr nos EUA em 1994. Em ordem de grandeza decrescente, são 7 as plantas transgênicas cultivadas em 1997: soja, milho, tabaco, algodão, canola, tomate e batata. Elas são cultivadas em somente seis países, dentre estes 64% (da área total cultivada) nos EUA, seguido pela China (14%), Argentina (11%), Canadá (10%), Austrália e México (1%) (KLEBA, 1998, p. 14).

Kleba (1998) afirma que “a soja *Round up Ready* (RR) da Monsanto é a primeira planta transgênica a ser aprovada para a alimentação humana e animal e para cultivo no Brasil”. Em 2006, o setor global das lavouras biotecnológicas continuou a crescer pelo décimo ano consecutivo a uma taxa de 13%, ou 12 milhões de hectares, alcançando 102 milhões de hectares. O número de países que utilizam lavouras biológicas aumentou de 21 a 22. Os EUA, seguidos pela Argentina, Brasil, Canadá, Índia e China, são os maiores produtores de lavouras biotecnológicas, com 54,6 milhões de hectares plantados. A soja atinge 57% da área global de agricultura biotecnológica; e o valor do mercado global de lavouras biotecnológicas foi de U\$\$ 6,5 bilhões, com uma previsão para acima de U\$\$ 6,8 bilhões em 2007 (JAMES, 2006).

Atualmente, 19 milhões de hectares são empregados com o plantio de culturas *Bt* e 13,1 milhões de hectares com tratamento combinado de plantas com o produto *Bt* e tolerância a herbicidas, principalmente expressando toxinas efetivas contra Lepidoptera (FERRY *et al.*, 2004; JAMES, 2006). De fato, todas as variedades transgênicas comerciais

disponíveis com resistência a pragas foram desenvolvidas usando genes *cry* de *B. thuringiensis* (CASTLE *et al.*, 2006). Assim, a seleção de populações de insetos resistentes às toxinas *Bt* tem sido uma preocupação. O uso de práticas de manejo, como provisão de refúgios (que fornecem as condições adequadas para a sobrevivência de insetos *Bt*-suscetíveis) tem obtido sucesso em prevenir a ocorrência de resistência ou retardar o seu surgimento. Além disso, a “piramidização” de genes codificando diferentes toxinas *Bt* foi desenvolvida como uma estratégia para prevenir ou retardar a ocorrência de pragas resistentes na população, e também com o objetivo de conferir maiores níveis de controle (KAUR, 2006; ZHAO *et al.*, 2003). Outras estratégias baseadas na expressão de toxinas produzidas por genes exógenos, tanto de origem vegetal (p.e., para lectinas e inibidores de enzimas digestivas) como de origem animal, inclusive de insetos (p.e., proteínas que ligam biotina, neurohormônios e inibidores enzimáticos), estão sendo desenvolvidas (FERRY *et al.*, 2004; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

No caso das fitopatologias, causadas principalmente por vírus, fungos e bactérias, variedades transgênicas comerciais estão disponíveis, na atualidade, apenas para as doenças viróticas (CASTLE *et al.*, 2006), apesar de genes conferindo resistência a doenças fúngicas e bacterianas já estarem disponíveis e plantas transgênicas resistentes já terem sido produzidas (GURR; RUSHTON, 2005). Além disso, genes com atividade nematicida (p.e., codificando inibidores de proteinases, bem como estratégias baseadas na interferência de RNA), estão sendo investigados para a produção de plantas transgênicas resistentes a fitonematóides, porém nenhuma variedade comercial com essa característica está disponível (ATKINSON *et al.*, 2003; CASTLE *et al.*, 2006). É necessário ressaltar que as perdas na produtividade das plantas causadas pelos nematóides chegam a cerca 12,3% ao ano. Em algumas culturas, podem chegar a 20%, como, por exemplo, na banana (BIRD *et al.*, 2003). Em termos financeiros, os prejuízos mundiais excedem 125 bilhões de dólares anualmente (CHITWOOD, 2003). Portanto, um desafio central a ser enfrentado pelo biotecnologista é a identificação de novos genes que irão produzir produtos inseticidas, nematicidas e fungicidas, com características adequadas para a geração de culturas transgênicas.

3.4 Potencial biotecnológico de bactérias no controle de pragas e doenças

As bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* vêm sendo intensivamente estudadas, como alternativas em potencial ao *B. thuringiensis* (MOAR, 2003). A toxicidade oral dessas bactérias está associada a uma pletera de substâncias inseticidas,

incluindo complexos de proteínas de alto peso molecular (conhecidas como toxinas *tc*, de *toxin complex*), que são secretadas diretamente no meio de cultura pelas bactérias, sendo ativas contra uma grande variedade de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Dictyoptera (BOWEN *et al.*, 1998; BOWEN; ENSIGN, 1998; BLACKBURN *et al.*, 1998). Os efeitos fisiológicos exercidos por estas toxinas em insetos suscetíveis são muito similares aos efeitos exercidos por δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* e incluem cessação de alimentação, perda da peristalse do intestino, paralisia do inseto e morte (BLACKBURN *et al.*, 1998; BOWEN *et al.*, 1998). Quatro complexos de toxinas de *P. luminescens* foram resolvidos em um gel nativo e denominados complexos de toxinas Tca, Tcb, Tcc e Tcd (BOWEN *et al.*, 1998; ENSIGN *et al.*, 1997). Hurst et al (2000) identificaram três genes de *S. entomophila*, *sepA*, *sepB* e *sepC*, que codificam proteínas com alto percentual de similaridade às toxinas inseticidas de *P. luminescens* e que são requeridas para causar a doença “âmbar” no escarabídeo *C. zealandica*. Os produtos gênicos *sep* mostram similaridade com membros de cada um dos loci de *P. luminescens*, *tca* (SepA com TcaB; SepB com TcaC), *tcb* (SepA com TcbA), *tcc* (SepA com TccB; SepC com TccC), e *tcd* (SepA com TcdA).

SepA e seus homólogos de *P. luminescens* exibem um motivo RGD (região com a sequência Arg-Gly-Asp que pode servir como um sítio de reconhecimento em células eucarióticas). O motivo RGD está presente nas adesinas de superfície de células produzidas pelo patógeno humano *Bordetella pertussis*, na hemaglutinina filamentosa (RELMAN *et al.*, 1989) e na proteína da membrana externa pertactina (LEININGER *et al.*, 1991), e tem sido implicado em aumentar a ligação de *B. pertussis* a células eucarióticas. O motivo RGD de SepA encontra-se em uma região de alta similaridade entre SepA e seu correspondente de *P. luminescens*, e possivelmente ele desempenha uma função na mediação da ligação das proteínas e/ou bactéria à membrana peritrófica do inseto.

SepB mostra forte similaridade ao TcaC de *P. luminescens* por toda sua extensão, e ambas as proteínas mostram alta similaridade com a extremidade aminoterminal do produto do gene de virulência SpvB de *Salmonella* (GULIG *et al.*, 1992). Acredita-se que SpvB aumente a sobrevivência da *Salmonella* virulenta em macrófagos, mas seu mecanismo de ação é desconhecido (LIBBY *et al.*, 1997). Baseado na similaridade com SpvB, foi sugerido que TcaC pode agir sobre os hemócitos do inseto (BOWEN *et al.*, 1998). No entanto, os hemócitos residem dentro da hemolinfa, e *S. entomophila* não invade a hemolinfa até o fim do processo de infecção (JACKSON *et al.*, 1993), sugerindo que SepB pode atuar de algum outro modo. A região comum entre SepC e TccC também mostra similaridade com as

proteínas associadas à parede celular de *B. subtilis* WapA (FOSTER, 1993), e a membros da família de elementos *rhs* de *E. coli*.

SepC codifica um centro hidrofílico protéico que contém nove variantes das repetições do motivo peptídico Rhs GxxRYxYDxxGRL(IT) (FEULNER *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1998). A propriedade de ligação a carboidratos demonstrada por Minet *et al.* (1999) para esses motivos, aliada ao fato de que esse tipo de interação está envolvida na toxicidade para insetos de diferentes tipos de proteínas, como lectinas e quitinases (MURDOCK *et al.*, 1990; FUKAMIZO, 2000), indicam que essas proteínas podem estar envolvidas na ação inseticida dessas bactérias. A similaridade entre os produtos gênicos *sep* e *tc* sugere que eles são membros de uma nova família de toxinas inseticidas.

O envolvimento de determinantes de doenças similares sugere que a histopatologia das doenças induzidas por *P. luminescens* e *S. entomophila* pode ser similar, a despeito do fato de que a doença “âmbar” é crônica, enquanto *P. luminescens* causa infecções agudas. Blackburn *et al.* (1998) examinaram a histopatologia do intestino médio de larvas de *Manduca sexta*, após o tratamento com Tca purificado (TcaA, TcaB/SepA, TcaC/SepB e TcaZ), injetado no intestino da larva ou por meio de alimentação em um cubo de dieta artificial. A ingestão da proteína Tca resultou na cessação da alimentação, edema nas células epiteliais do intestino médio, extrusão de vesículas dentro do lúmen do intestino e completa destruição do epitélio dentro de 12 h. A injeção da proteína também resultou em distorção das células do intestino médio. Em contraste, a infecção por *S. entomophila* não apresentou efeito histológico observável nas células epiteliais do intestino médio de *C. zealandica*, mas mostrou uma redução no número de células gordurosas para níveis quase não-detectáveis e um esvaziamento do intestino larval (JACKSON, 1993). A expressão em *Arabidopsis thaliana* do gene *tcdA* (de *P. luminescens*), codificando uma toxina com 283 kDa, resultou em plantas com alta toxicidade para *Manduca sexta* e *Diabrotica undecimpunctata howardi*, demonstrando a aplicabilidade dessas proteínas para o controle de pragas (LIU *et al.*, 2003).

Segundo Sergeant *et al.* (2003), bactérias do gênero *Xenorhabdus* possuem proteínas homólogas às toxinas de *P. luminescens* e *S. entomophila*. Esses autores expressaram 4 genes *xpt* de *X. nematophylus* em *E. coli*: *xptA1* (*tcdA/sepA-like*; 7.841 pb; proteína predita de 287 kDa), *xptA2* (*tcdA/sepA-like*; 7.647 pb; proteína predita de 285 kDa), *xptB1* (*tccC/sepC-like*; 3.047 pb; proteína predita de 111 kDa) e *xptC1* (*tcdB/sepC-like*, 4.256 pb; proteína predita de 160 kDa). A combinação entre os genes *xptA1* e os genes *xptB1* e *xptC1* foi tóxica para *Pieris brassicae* e *Pieris rapae*, enquanto *xptA2* em conjunção com *xptB1* e *xptC1* mostraram significativa atividade contra *Heliothis virescens*. Posteriormente

outros estudos confirmaram que existem dois complexos de toxinas inseticidas em *X. nematophila*, nos quais os genes *xptA1* e *xptA2* exibem um espectro diferente de atividade, mas ambos requerem os produtos dos genes *xptB1* e *xptC1* para produzir atividade inseticida plena contra pragas como *P. brassicae*, *Plutella xylostella*, *H. virescens* e *Heliothis zea* (LEE *et al.*, 2007). Sergeant *et al.* (2006) identificaram os genes *xpt* em *Xenorhabdus bovienii*, que apresentaram uma baixa atividade contra os insetos *Pieris brassicae*, *Aedes aegypti* e *Phaedon cochleariae*, quando comparados com os genes *xpt* de *X. nematophylus*. Esta classe de proteínas ocorrendo como toxinas para insetos não está restrita a essas três bactérias, uma vez que atualmente elas são reconhecidas em um número crescente de espécies e está emergindo como uma nova classe de toxinas de bactérias. Genes homólogos aos que codificam as proteínas dos complexos de toxinas citados acima foram encontrados em *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, *Fibrobacter succinogenes*, *Treponema denticola*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis* (LEE *et al.*, 2007).

Bactérias púrpuras tais como *Chromobacterium violaceum* Bergonzini têm sido isoladas com pouca frequência de insetos e durante muito tempo não foram descritas como patógenos de insetos (BUCHER, 1981). Bactérias desta espécie foram isoladas do trato digestivo do “maior broqueador dos grãos” *Prostephanus truncatus* (Horn), onde ela pode estar envolvida na digestão da celulose (VAZQUEZ-ARISTA *et al.*, 1997) formando uma associação mais simbiótica que patogênica. Mais recentemente, Martin *et al.* (2004) relataram a recuperação de um isolado do solo, identificado como *Chromobacterium* sp. A toxicidade da bactéria foi avaliada contra o segundo instar do “besouro colorado da batata” *Leptinotarsa decemlineata*. Em cultura líquida, *Chromobacterium* sp. PRAA4-1 causou 75% de mortalidade nas larvas deste inseto. Posteriormente identificada como *Chromobacterium suttsuga*, esta bactéria púrpura foi testada contra uma variedade de insetos e mostrou ser tóxica a pragas agrícolas das ordens Lepidoptera, Hemiptera/Homoptera, Heteroptera assim como da ordem Coleóptera (MARTIN *et al.*, 2003; GELMAN *et al.*, 2005), onde verificou-se 100% de mortalidade para *L. decemlineata* e *Bemisia tabaci* (biótipo B), e 80% de mortalidade para *Diabrotica speciosa* após 5 dias de alimentação em dietas artificiais contendo a bactéria; e 100% de mortalidade para *Nezara viridula* após 6 dias de alimentação com água contendo células de *C. suttsuga*.

3.5 *Chromobacterium violaceum*

3.5.1 Generalidades

Durán (2001) define a *C. violaceum* (Figura 4) como uma “bactéria saprófita não-patogênica, Gram-negativa e aeróbica facultativa, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes”. A seqüência do gene ribossomal 16S de *C. violaceum* foi estudada em 1989 por Dewhirst e colaboradores, e a seqüência do gene RNAr 23S foi determinada em 1999 por Harmsen e Singer. Esses resultados confirmam a posição filogenética da *C. violaceum* dentro do ramo das proteobactérias Beta, da família Neiseeriacea (DURÁN, 2001). De fato, esta proteobactéria domina uma variedade de ecossistemas em regiões tropicais e subtropicais, e a habilidade de *C. violaceum* de obter sucesso sob diversas condições ambientais é claramente facilitada pelo seu versátil metabolismo de geração de energia, que é capaz de explorar muitas fontes de energia pelo uso apropriado de oxidases e redutases, o que permite coletivamente as respirações aeróbica e anaeróbica. Na ausência total de oxigênio, nitrato ou fumarato são usados como aceptores finais de elétrons (VASCONCELOS, 2003).

Sobre a descoberta e a classificação de *C. violaceum*, Durán (2001) relata que Boisbaudran, em 1882, publicou um artigo atribuindo a formação de uma coloração violeta sobre um preparado à base de farinha a um “pequeno organismo”, provavelmente se referindo a *C. violaceum* e à violaceína, considerando o espectro de absorção de luz visível registrado pelo autor. Bergonzini (1880) obteve uma solução coberta por uma película densa de intensa coloração violeta, a partir de soluções de albumina de ovo armazenadas por cerca de um mês, e após alguns testes e experimentos, concluiu que se tratava de uma nova bactéria, a que chamou *Cromobacterium violaceum* (Bergonzini, 1881). De acordo com Buchanan (1917), a grafia foi corrigida por Zimmerman (1881), para *Chromobacterium*, que até 53 anos após esta publicação ainda era chamada de *Bacillus violaceus*.

No Brasil, a *C. violaceum* só foi descoberta quase um século depois. Em abril de 1976, na frente da estação de tratamento de água da cidade de Manaus (Amazonas) foi recolhida uma amostra de água proveniente de uma profundidade de 30 metros. O objetivo era realizar uma análise bacteriológica dessa amostra, e os resultados indicaram a existência de apenas dois tipos diferentes de colônias bacterianas: colônias brancas e violetas. As violetas foram identificadas pelo Prof. Wilson Chagas de Araujo, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, como sendo a *C. violaceum* (DURÁN, 2001, pp. 38-39).

A notável abundância da *C. violaceum* na água e margens do Rio Negro (afluente do Rio Amazonas, no Brasil) é indicativa da sua habilidade de resistir simultaneamente a uma variedade de condições ambientais relativamente inóspitas, incluindo a escassez de nutrientes,

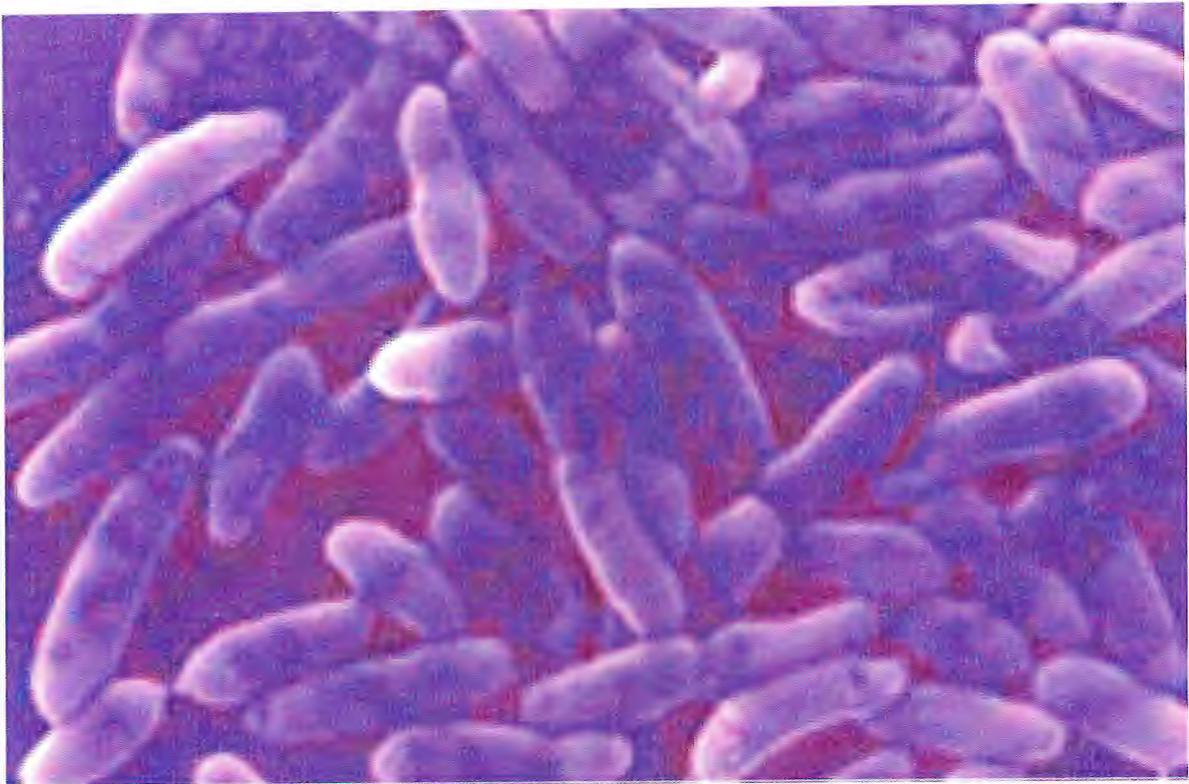


FIGURA 4 – Micrografia eletrônica de *Chromobacterium violaceum*. Fonte: www.cienciahoje.uol.com.br. (21/04/2007). Foto: Márcia Attias/UFRJ.

altas temperaturas (em torno de 40 °C), altos níveis de radiação, e elevadas concentrações de agentes tóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (CALDAS *et al.*, 1978; CALDAS, 1990; DURÁN *et al.*, 1994). Em um nível significativo, a habilidade de lidar com tais estresses ambientais está relacionada com o grande número de transportadores específicos presentes. Mais crucialmente, esses transportadores permitem a eficiente exploração de concentrações muito baixas de nutrientes e são também responsáveis pela resistência da *C. violaceum* a muitos agentes tóxicos, embora no último caso vários outros tipos de proteínas de resistência são também operativos. Outra contribuição de suma importância para a resistência à toxicidade ambiental é fornecida por uma série de proteínas que asseguram a manutenção da integridade celular (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

A coloração violeta associada à forma pigmentada de *C. violaceum* é conferida pelo pigmento púrpura denominado violaceína, um derivado do L-triptofano cuja estrutura química foi deduzida em 1958 por Ballantine e colaboradores, sendo finalmente analisada espectroscopicamente por Lattash *et al.* (1984). Na década de 90, outros compostos foram propostos como intermediários na síntese de violaceína, como o ácido cromopirrólico, proviolaceína, prodeoxiviolaceína e pseudoviolaceína, além de rearranjos intramoleculares do anel indólico no lado do 5-hidroxiindol (MOMEN; HOSHINO, 2000). Embora a *C. violaceum* apresente a capacidade de viver sob condições aeróbicas e anaeróbicas, “a violaceína é produzida somente na presença de oxigênio”, afirmam Konzen *et al.* (2006). Em estudo recente, Matz e colaboradores (2004) mostraram que a violaceína é tóxica para bacterívoros nanoflagelados, sugerindo que esta atividade pode ser útil para a sobrevivência da bactéria. Por outro lado, existem evidências de que a violaceína contribui para a proteção contra radiação UV. A violaceína é um dos grandes atrativos da *C. violaceum*, de interesse médico e biológico, introduzida como composto terapêutico para propósitos dermatológicos (CALDAS *et al.*, 1978).

A *C. violaceum* pode, embora definida como uma bactéria saprófita não-patogênica, atuar como um patógeno oportunista em animais e homens, causando septicemia fatal de lesões na pele com abscessos no fígado e no pulmão, bem como granulomatose crônica, adenite, como complicação da granulomatose crônica, osteomielite, celulite periorbital e infecção ocular (DURÁN, 2001). Segundo Rettori (2000), o potencial patogênico da *C. violaceum* foi comprovado por Wooley nas Filipinas, em 1905, com a morte de “búfalos d’água”. Posteriormente, outros casos de infecção de animais foram descritos em porcos, macacos, ovelhas e cães. O fato de que o Rio Negro é a principal fonte da água ingerida pela população local, sem freqüentes ocorrências de infecções, é indicativo da baixa

infectividade desse organismo. No entanto, Bilton e Johnson (2000) alertam que, apesar da *C. violaceum* ter sido considerada um agente patogênico de baixo grau nos Estados Unidos e da baixa incidência de relatos de infecção em humanos, foram descritos alguns casos de infecções graves e mesmo fatais no Brasil e em outros países. As ocorrências incluem uma infecção severa numa criança de 12 anos, que não apresentava imunodepressão. Durán *et al.* (2001) relatam que “algumas cepas de *C. violaceum* mostraram resistência a rifampicina e vancomicina, o que pode aumentar o potencial patogênico dessa bactéria”.

Os casos mais básicos de mecanismos e estratégias que dão suporte à adaptabilidade de *C. violaceum*, incluindo a observada, embora rara, infecção de humanos, não têm sido investigados profundamente aos níveis genético e molecular (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Konzen *et al.* (2006) sugerem que “a violaceína provavelmente interage com a membrana celular da bactéria durante o processo de infecção para ajudar na sua proteção contra o *stress* oxidativo gerado pelo sistema imune do hospedeiro”.

3.5.2 Potencial biotecnológico da *C. violaceum*

Os primeiros relatos de atividade biológica da *C. violaceum* foram publicados no final da década de 40, quando “os cientistas Kidder e Stuart (1939) e Burbank (1942) reportaram suas observações sobre protozoários ciliados que eram rapidamente mortos quando expostos a culturas de *C. violaceum*” (DURÁN *et al.*, 2001).

O pesquisador Singh reportou, em 1942, que ao adicionar extrato bruto de violaceína a suspensões de bactérias, estas não mais eram ingeridas por amebas terrestres. A essa constatação somou-se o fato de que, na época, haviam sido relatadas mortes por septicemia devido a *C. violaceum*. Em todos os casos, chamou a atenção o fato de que, na região das infecções, não se notava a presença de outros microrganismos além da *C. violaceum*, o que os levou a suspeitar da possível atividade antibiótica da violaceína (Durán, 2001, p. 41).

Desde então, vários trabalhos descreveram atividades biológicas para a violaceína. Esse composto exibe atividade antimicrobiana contra os importantes patógenos *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA *et al.*, 1999), *Trypanosoma cruzi* (DURÁN *et al.*, 1994), e *Leishmania* sp. (LEON *et al.*, 2001) e existem relatos de atividade bactericida (LICHSTEIN; VAN DE SAND, 1945; DURÁN *et al.*, 1983; CALDAS, 1990; DURÁN, 1990), antiviral (DURÁN; MENCK, 2001), e antitumoral (UEDA *et al.*, 1994; MELO *et al.*, 2000). No que diz respeito à atividade antitumoral, foram obtidos excelentes resultados em culturas de células de leucemia, linfomas, pulmão e cólon (DURÁN;

HAUN, 1997; MELO *et al.*, 2000) e em linfomas relacionados com a AIDS (DURÁN; HAUN, 1997). Shirata *et al.* (2000) relataram atividade antifúngica e indicaram a aplicação da violaceína como fungicida.

Para uma melhor exploração do potencial biotecnológico da *C. violaceum*, bem como para contribuir para a elucidação dos mecanismos e estratégias relacionadas à sua adaptabilidade a diferentes ambientes, o genoma da *C. violaceum* ATCC 12472 foi completamente seqüenciado por um consórcio de laboratórios, integrantes do Projeto Genoma Brasileiro (www.brgene.lncc.br). Alguns trechos do genoma da *C. violaceum*, com interesse biotecnológico, já eram conhecidos antes do início das atividades do Projeto Genoma Brasileiro - Rede Nacional de Seqüenciamento de DNA. Entre eles estão os genes envolvidos na biossíntese da violaceína (PEMBERTON *et al.*, 1991; AUGUST *et al.*, 2000; HOSHINO, 1999), da fenilalanina hidroxilase (ONISHI *et al.*, 1991; BEINERT, 1991; VOLNER *et al.*, 2000), da sintetase do ácido polihidroalquílico (KOLIBACHUK *et al.*, 1999; HUISMAN *et al.*, 2000), fragmentos genômicos contendo *orfD* (homólogo a SoxR de *E. coli*) (KOLIBACHUCK; DENNIS, 1998) e seqüências de genes que codificam RNAs ribossomais 16S e 23S (HARMSSEN; SINGER, 1999). Entretanto, apesar de alguns trechos do genoma da *C. violaceum* ter sido estudados, estes se basearam no conhecimento de somente uma pequena fração da constituição genética do organismo. Portanto, somente a partir do seqüenciamento do genoma completo da estirpe ATCC 12472 da *C. violaceum* foi possível obter um retrato mais detalhado da complexidade molecular requerida para a versatilidade desse organismo, assim como um extenso compêndio de ORFs que significativamente aumentou o potencial biotecnológico dessa bactéria (VASCONCELOS *et al.*, 2003; *Brazilian National Genome Project Consortium*: www.brgene.lncc.br).

Em adição ao *operon*, responsável pela síntese do pigmento violaceína, existem muitas outras ORFs codificando produtos de interesse médico e biotecnológico. Por exemplo, a detoxificação ambiental pode ser mediada por um *acid dehalogenase* (CV0864), possivelmente ativo em xenobióticos ou produtos metabólicos (JANSSEN *et al.*, 1994), e também por um *operon* para resistência a arsênico (CV2438 e CV2440) e enzimas que catalisam a hidrólise de cianato (ANDERSON *et al.*, 1990). O cianeto pode ser usado para a solubilização de ouro por meio de um processo livre de mercúrio, que evita a contaminação ambiental (SMITH; HUNT, 1985; CAMPBELL *et al.*, 2001), além de estar associado com a supressão de doenças fúngicas de raízes (LAVILLE *et al.*, 1998).

De interesse para a agricultura são os genes codificando quitinases (CV2935, CV3316 e CV4240) encontrados em *C. violaceum*. As quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas

capazes de hidrolisar a quitina, um polímero linear de N-acetil-D-glucosamina, cujos resíduos são unidos por ligações β -(1-4). A quitina é encontrada na cutícula de insetos e nematóides, na carapaça de crustáceos e na parede celular de muitos fungos. Portanto, pela ação hidrolítica que apresentam sobre a quitina, os efeitos inseticida, fungicida e nematicida de várias quitinases isoladas de diferentes organismos revelam o potencial dessas enzimas para a proteção de plantas (LAMB *et al.*, 1992; FUKAMIZO, 2000; HEIL; BOSTOCK, 2002). Ademais, uma proteína potencialmente inseticida e nematicida (CV1887), similar às de *X. bovienii* e *P. luminescens* (CHEN *et al.*, 1996) é também sintetizada por *C. violaceum*.

C. violaceum apresenta também ORFs para a síntese de compostos relevantes para a medicina, incluindo uma policetídeo sintase (CV4293) e outras proteínas aplicáveis à síntese de antibióticos, genes para a síntese de fenazina (CV0931 e CV2663) com potencial atividade antitumoral, e hemolisinas (CV0231, CV0513, CV1918, CV3342 e CV4301) com potencial como anticoagulantes (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Já está estabelecido que *C. violaceum* tem a capacidade para a síntese de polímeros polihidroxialcanoato (CAMPBELL *et al.*, 2001; FLEISCHMANN *et al.*, 1995), que têm propriedades físicas similares às do propileno, tornando-os importantes fontes renováveis de plástico biodegradável. Vasconcelos *et al.* (2003) identificaram ORFs relacionadas à biossíntese de celulose (CV2675, CV2677 e CV2678) com grande potencial para a comercialização, já que a celulose de bactérias difere daquelas produzidas por plantas em estrutura tridimensional, grau de polimerização e propriedades físico-químicas (ROMLING, 2002).

3.5.3 Proteínas com repetições YD

Vasconcelos *et al.* (2003) identificaram o gene CV1887 de *C. violaceum*, cujo produto apresenta similaridade com a “proteína nematicida 2” de *X. bovienii* (número de acesso no GenBank: CAC19493) e com proteínas contendo repetições YD (tirosina-ácido aspártico) de outras bactérias. Cada seqüência consenso, contendo as repetições YD tem um comprimento de cerca de 20 aminoácidos. A seqüência consenso é **Gx3-9YxYDx2GR(L, I ou V)x3-10G**, onde **x** representa qualquer aminoácido (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000). As teneurinas, família de proteínas transmembranares conservadas entre vertebrados e invertebrados, são as únicas proteínas de eucariotos que apresentam tais repetições YD (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000; TUCKER *et al.*, 2007). Nos procariotos, repetições com esse motivo foram inicialmente detectadas nas proteínas codificadas pelos elementos *Rhs* (*rearrangement hot spot*) de *E. coli*

(FEULNER *et al.*, 1990; SADOSKY *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 1993) e na proteína WAPA (*Wall Associated Protein A*) de *Bacillus subtilis* (FOSTER, 1993). A função das proteínas Rhs ainda está sendo estabelecida, mas propõe-se que elas são proteínas de ligação a ligantes associados à superfície celular, baseado em sua similaridade com WapA (FOSTER, 1993).

É importante observar que uma das toxinas do complexo Tc de *P. luminescens*, TccC, possui 9 repetições YD na sua seqüência, assim como SepC, proteína codificada no plasmídio pADAP de *S. entomophila*, bem como a proteína XptB1, de *X. nematophyllus*, homóloga a SepC e TccC. A proteína SepC, juntamente com outras duas toxinas, SepA e SepB, são suficientes para causar a doença “âmbar” em *C. zealandica* (HURST *et al.*, 2000; HURST *et al.*, 2004; SERGEANT *et al.*, 2003). A alta similaridade de SepC com TccC é observada nos primeiros 680 aminoácidos dos 10000 aminoácidos das proteínas. A região comum entre SepC e TccC também mostra similaridade com as proteínas associadas à parede celular de *B. subtilis* WapA (um protótipo da família de hipotéticas proteínas associadas a paredes celulares de bactérias) e a membros da família de elementos *rhs* de *E. coli*. A família de elementos Rhs tem uma estrutura não usual, com um centro rico em GC (62%) com cerca de 3.7 kb comum a todos os membros, seguido de uma região de extensão rica em AT (60%) de 400 a 600 pb que é exclusiva para cada membro da família. Uma única ORF encontra-se no centro rico em GC e termina na região de extensão, que também codifica uma segunda pequena ORF (FEULNER *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1998). Apesar de menor que os elementos Rhs típicos, *sepC* codifica um centro hidrofílico protéico que contém nove variantes das repetições do motivo peptídico Rhs GxxRYxYDxxGRL(IT) (FEULNER *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1998). Existe também alta similaridade entre SepC, TccC, WapA e SC2H4.02 de *S. coelicolor* A3(2) na extremidade carboxílica do centro Rhs, que termina em um resíduo de glicina conservado (WANG *et al.*, 1998). Após o resíduo de glicina a similaridade entre cada uma das proteínas diminui, resultando em diferentes terminações carboxílicas, como também ocorre com elementos Rhs.

Foi verificada a existência de genes codificando proteínas contendo diferentes números da repetição YD, no genoma da *C. violaceum* incluindo os genes CV1887 (Figura 5) e CV1238, com 12 repetições; CV1431, com 16 repetições; e os genes CV2776 e CV1429, com 4 e 3 repetições, respectivamente.

MADNTGIYSQAFNFSSAVNGGVDPRTGLFSFNFDLGILSANQGLTPALPLRIAYFPLAAGESSDGLGKGFSMGGFI
 KYDRLRRLILASGERYRLLDEDSAPVFIRQLKLDVVRVHRTVADGVRRYRIVLKNGEIHHLSAPWGPDIYVPEKIQ
 PLGHALYLSWDSPGAGRLRLKEVRDEEKRTLFRIDYPNADGERVAITQWPDSDDEKVALELYFQNGYLHRIVNKS
 LSGNGDVEWTLGYETDSKVADAVGGLLNELTAPTGLAQRVRYEPLCMKLQGERSDFGLPAVVLHSLVPEAGQP
 AINTHEEYSPANYLGYGASFKGSQGGADELFDIQVPYTYQSTEKLLDKSLNPAKPIRTTVRKYNNFHLLVSEEVRE
 GACVFRQETAYPAKVGQSYEAQPATFQLPVRQTMSWEAAGRSRRESISFEYDDAGQLIKQTMSDGSITVLEYYP
 PAGEPGHCPADAEGFGRYLKSKTVFPSVSAEYGDAMAMRTEYVFRSIRTRPGSAHAEAAILQQTVSHYAGMPGPK
 ARAAMLGGKPSWEAYQPRQLAKESYDYLDAPAQKDHGRIKKRIAVVYGEDRTPYEMVQDFVFEPVRSNGREVA
 LKQTVSVTVKEDPLEKKDGKLQKVSSTRVLSVLTGRLLSETDVLGNTVAYGYDPLGRLKTQTAHPDLKAYRAIAR
 WDYLWPSTKNGTPAMAIHTDALGNQTRTSHDGLGRMIREEACDRDGGLGWKTVRTHLYDEAGRQA RTTVTDVV
 HDREGKPVTLKSTTEREWDSWGQLSVERELETGLASRQEIDPIAQT VATWQAGTDRCSAKYMNFYSGKSHDLE
 RRIVLAYHLESRSWDAEDKPYSVASWGWGDAHRLRRATDEMSHATGYRYDAWGRTVEIVLPDGS AVRKQYAPF
 SQAALPTQISVADKGVETVAGTQKFDGLGRLKRTESGGRPTRFEYASDAASSPRTVTGPDGRVQVYAVDDRLGE
 ALKSVAAPDHQLGVSPQQTYSYLLPMGLLHEAEEVGGQAQSAWDRWPSGRLREETHDIRSGGKKKAHYRYSL
 TGNLEGGADIDGAAHARSYETAAAHVGKLI EIADA AVTVTLAYDGLQRLCSWTARDGRGHALATTLEFDSL GRET
 KRTLAAESAEATLSQEWYPNGQLHQRKRSECGKPFCD ETVYDARNRLKDYAASGPGLPKDAYGNAIRGQKF
 EFDAFNNIRKCTTVLDGGSENVGEYLFENPADPCQLTKVTNSALDKGYPPAIELKYDQAGRLERDEAGRRLSYDA
 LGRLARVEGGGSASYGYDAHDRLVCQRVETSGMDHRLYRANRLVNEWMTRSGQAPGADDDRVLVYAAG
 SCAAQVNEGGDGSVAALMGTDGKGSIVSQAEGGQAKHYAYTPYGHQSSP

FIGURA 5 – Sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene CV1887 de *C. violaceum*. As regiões contendo motivos completos ou parciais da repetição YD estão destacadas, assim como os resíduos conservados dentro de cada repetição em relação à sequência consenso.

Minet *et al.* (1999) demonstraram que as repetições YD da Teneurina-1 de *Gallus gallus* ligam-se a heparina. Esses autores então propuseram essa repetição como um novo domínio de ligação a carboidratos. Entretanto, estudos semelhantes ainda não foram realizados em proteínas bacterianas com repetições YD. Se esses motivos são responsáveis pela interação com carboidratos observada para as teneurinas, é possível que o mecanismo de ação das toxinas de TccC, SepC e XptB1, das bactérias *P. luminescens*, *S. entomophila* e *X. nematophyllus*, respectivamente, envolva a ligação dessas proteínas com carboidratos dos insetos suscetíveis, a exemplo do que se observa com outras classes de proteínas tóxicas como as lectinas e as quitinases (MURDOCK *et al.*, 1990; HUESING *et al.*, 1991; FUKAMIZO, 2000; HEIL; BOSTOCK, 2002).

4 MATERIAIS

4.1 Espécimes de *Callosobruchus maculatus*

Os adultos de *C. maculatus* do Ceará foram originalmente coletados a partir de sementes de caupi infestadas, coletadas no comércio de Fortaleza em janeiro de 2004 e identificados de acordo com SANTOS (1971). Os adultos de *C. maculatus* do Rio Grande do Norte foram originalmente fornecidos pelo Prof. Dr. Maurício Pereira Sales (UFRN), e multiplicados no Laboratório de Genética Molecular da UFC.

4.2 Plasmídeos e cepas bacterianas

A estirpe ATCC 12472 da *C. violaceum* foi adquirida da distribuidora Interlabdist da ATCC (*American Type Culture Collection*).

O vetor de clonagem utilizado foi o plasmídeo pGEM-T *Easy* (Promega, Madison, WI, USA) e o vetor de expressão usado foi o plasmídeo pBAD/*Myc*-His C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Como controle da indução de expressão da proteína recombinante rCV1887, foi utilizado o plasmídeo pBAD/*Myc*-His/*lacZ* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

E. coli, estirpe DH10B, foi utilizada como hospedeiro de clonagem e *E. coli* TOP10 foi empregada como hospedeiro de expressão.

4.3 Enzimas e demais reagentes

Ribonuclease bovina I A (RNase A) foi adquirida da Pharmacia Biotech (USA). *Taq* DNA polimerase e seu respectivo tampão 10X foram produzidos no Laboratório de Genética Molecular – UFC.

As enzimas de restrição *Bgl*III e *Sna*BI, acompanhadas de seus respectivos tampões de reação 10X, foram adquiridas da BioAgency (New England Biolabs); T₄ DNA ligase e seu respectivo tampão de reação, da USB Amersham Biosciences (Cleveland, OH, USA USA). DNase I foi adquirida da Promega (Madison, WI, USA).

Oligonucleotídeos iniciadores complementares às seqüências CV1887 foram sintetizados pela Invitrogen (USA). O conjunto para purificação de DNA em gel de agarose GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, foi adquirido da Amersham Biosciences (USA).

O marcador de peso molecular de ácidos nucléicos usado nas eletroforeses em gel de agarose foi o λ DNA/*Hind* III (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

O marcador de baixo peso molecular de proteínas usado nas eletroforeses em gel de poliacrilamida foi o *Bench Mark Pre-stained Protein Ladder* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

O marcador de alto peso molecular de proteínas usado nas eletroforeses em gel de poliacrilamida foi o *High Molecular Weight-SDS (HMW-SDS) Calibration Kit for Electrophoresis* (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA), contendo as proteínas Miosina (212 kDa), α_2 -Macroglobulina (170 kDa), β -Galactosidase (116 kDa), Transferrina (76 kDa) e Desidrogenase glutâmica (53 kDa).

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

5. MÉTODOS

5.1 Avaliação da atividade inseticida de *C. violaceum* sobre larvas de *C. maculatus*

5.1.1 Criação dos insetos adultos de *C. maculatus*

Os insetos foram multiplicados no Laboratório de Genética Molecular, no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, utilizando-se como substrato alimentar sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), adquiridas no comércio de Fortaleza-Ceará. As sementes foram acondicionadas em recipientes de vidro fechados com um tecido poroso de *nylon*, em uma temperatura de 27 ± 2 °C.

5.1.2 Preparação das dietas artificiais

As sementes artificiais foram preparadas de acordo com o método descrito por Leite *et al.* (2005). Sementes de *V. unguiculata* L. obtidas no comércio de Fortaleza-CE, depois de verificada a suscetibilidade ao *C. maculatus*, foram selecionadas (descartando as sementes com danos físicos ou vestígios de insetos e patógenos), descascadas, trituradas em liquidificador, em seguida em moinho elétrico para café, e incorporadas nas proporções adequadas com o material cuja atividade contra o caruncho *C. maculatus* foi avaliada. Em seguida a mistura foi compactada em cápsulas transparentes de gelatina (2 cm x 0,7 cm). Cápsulas contendo somente farinha do feijão-de-corda foram utilizadas como controle. As cápsulas foram acondicionadas a 27 °C \pm 2 °C em potes de plástico com tampas perfuradas e aclimatadas pelo menos 24 h antes da infestação com os adultos de *C. maculatus* (Figura 6).

5.1.3 Delineamento Experimental

Os ensaios biológicos obedeceram a um delineamento experimental inteiramente casualizado. No início dos ensaios, cápsulas de um mesmo tratamento foram mantidas em um único recipiente, onde foram então acrescentados insetos (machos e fêmeas), com idade de 0 – 24 horas. Decorrido este período foi contado o número de ovos sobre as cápsulas, e o excesso foi removido com o auxílio de um estilete, até que o número final de ovos em cada cápsula atingisse 8, quantidade que permite o desenvolvimento das larvas sem a interferência de competição por alimento.

Após a primeira contagem de ovos os insetos foram removidos. Após uma semana, tempo necessário para eclosão das larvas, foi realizada uma segunda contagem. Na segunda contagem foi observado se houve eclosão da larva, contando-se o número de ovos



FIGURA 6 – Sementes artificiais utilizadas nos bioensaios com *C. maculatus*. Os pontos escuros nas cápsulas correspondem a insetos nos últimos estágios de desenvolvimento, antes da emergência na fase adulta.

com evidências de eclosão e o número de ovos com a larva do 1º instar. Após a segunda contagem as cápsulas foram distribuídas nas repetições com o intuito de manter um número total dos ovos com eclosão aparente semelhante em cada repetição. Foi verificada semanalmente a saída de larvas das cápsulas. Aproximadamente 20 dias depois da infestação as cápsulas passaram a ser verificadas diariamente para se coletar os dados da emergência dos adultos de *C. maculatus*. Os adultos emergidos foram contados e pesados diariamente. O tempo total do experimento foi calculado a partir do dia em que emergiu o primeiro inseto, usando como marco zero a data da infestação das cápsulas, e as contagens foram realizadas até 5 dias antes da emergência de insetos de uma possível segunda geração.

Todos os dados quantitativos obtidos foram analisados quanto à variância (ANOVA), pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2001).

Estão descritos, a seguir, os parâmetros biológicos de *C. maculatus* mensurados e submetidos às análises estatísticas:

a) Percentual de eclosão de larvas

Esse parâmetro foi avaliado para os bioensaios onde o desempenho dos insetos alimentados com dietas artificiais foi testado em sementes de *V. unguiculata*. Os ovos dos quais as larvas eclodiram e os inférteis ou com larvas do 1º instar mortas foram contados 10 dias após a infestação das sementes de feijão-de-corda.

$$%EL = \frac{NLE}{NTO} \times 100$$

onde $%EL$ = percentual de eclosão de larvas

NLE = número de larvas eclodidas

NTO = número total de ovos

b) Percentual de emergência de adultos

Esse parâmetro é uma estimativa de quantos insetos conseguiram atingir a fase adulta em relação à quantidade de larvas que penetraram nas sementes. É um indicativo do efeito dos tratamentos na sobrevivência dos insetos durante o experimento.

$$\%EM = \frac{NTA}{NLE} \times 100$$

onde $\%EM$ = percentual de emergência de adultos

NTA = número total de adultos emergidos

NLE = número de larvas eclodidas

c) Tempo médio de desenvolvimento

Corresponde ao número médio de dias que os insetos levaram para completar o desenvolvimento, desde a eclosão da larva até a emergência do adulto.

$$TMD = \frac{\sum(DAO \times NAE)}{\sum NAE}$$

onde TMD = tempo médio de desenvolvimento

DAO = número de dias que os adultos levaram para emergir, contados a partir da data de infestação determinada como dia zero.

NAE = número de adultos emergidos em cada DAO

d) Peso médio dos adultos

Foi estimado no sentido de avaliar o efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento dos insetos que sobreviveram à dieta, completando o ciclo.

$$PM = \frac{\sum PA}{NTA}$$

onde PM = peso médio dos adultos recém-emergidos

PA = peso individual dos adultos recém-emergidos

NTA = número total de adultos emergidos

e) Número de ovos por fêmea

Esse parâmetro foi avaliado para os bioensaios onde os insetos alimentados com dietas artificiais foram testados em sementes de *V. unguiculata*, no sentido de comparar a capacidade individual das fêmeas de *C. maculatus* durante o período de oviposição.

$$NO/F = \frac{NTO}{NF}$$

onde NO/F = número de ovos por fêmea

NTO = número total de ovos

NF = número de fêmeas em cada repetição

5.1.4 Bioensaio I

A estirpe padrão de *C. violaceum* ATCC 12472 foi cultivada em 1400 mL de caldo nutritivo. Após 40 h de incubação sob agitação orbital constante a 200 rpm a 37 °C, foi retirada uma alíquota de 2 mL para leitura da absorbância (600 nm) e mais 2 mL para a contagem de células viáveis. Diluições seriadas em solução salina (NaCl 0,9%) foram realizadas após a leitura da absorbância.

Uma alíquota de 100 µL das diluições (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9}) foi semeada sobre placas contendo meio agar nutritivo (caldo nutritivo contendo bacto-agar

1,5%), com duas repetições para cada tratamento. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A contagem das colônias foi feita somente nas placas com as diluições de 10^{-5} a 10^{-7} .

Após o tratamento, a cultura foi centrifugada por 25 min a 10.040 x g, a 4 °C, para separar o meio de cultura das células. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água destilada, diluídas em água destilada, congeladas em N₂ líquido e liofilizadas (Figura 7).

O ensaio biológico foi conduzido com 10 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos consistiram de 2 controles com cápsulas contendo apenas farinha de *V. unguiculata*, um deles infestado com insetos do Ceará e o outro infestado com insetos do Rio Grande do Norte; células de *C. violaceum* nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0% e 2,0%, infestados com insetos do Ceará; e células de *C. violaceum* nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0% e 2,0%, infestados com insetos do Rio Grande do Norte. Cada tratamento continha 32 cápsulas, infestadas com 40 insetos. Um casal emergido de cada repetição foi utilizado para infestar parcelas correspondentes a cada um dos tratamentos testados, contendo 100 sementes de *V. unguiculata*, para a avaliação do desempenho dos insetos alimentados com dietas artificiais.

5.1.5 Bioensaio II

A estirpe padrão de *C. violaceum* ATCC 12472 foi cultivada em 500 mL de caldo nutritivo. Após 24 h de incubação sob agitação orbital constante a 200 rpm a 28 °C, foi retirada uma alíquota de 2 mL para leitura da absorbância (600 nm) e mais 2 mL para a contagem de células viáveis. Diluições seriadas em solução salina (NaCl 0,9%) foram realizadas após a leitura da absorbância.

Uma alíquota de 100 µL das diluições (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) foi semeada sobre placas contendo meio agar nutritivo (caldo nutritivo contendo bacto-agar 1,5%), com duas repetições para cada tratamento. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A contagem das colônias foi feita somente nas placas com as diluições de 10^{-6} e 10^{-7} .

A cultura foi aquecida a 100 °C por 30 min. Após o tratamento, a cultura foi centrifugada por 3 séries de 15 min a 10.040 x g para separar o meio de cultura das células. O meio de cultura foi dividido em duas alíquotas de 250 mL. A primeira parte foi filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore) e a segunda parte permaneceu sem filtração. As células e o



FIGURA 7 – Células de *Chromobacterium violaceum*. Material liofilizado destinado ao biensaio.

exsudato foram congelados e posteriormente liofilizados. Apenas as células foram usadas nesse experimento.

O ensaio biológico foi conduzido com 4 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos consistiram de 1 controle com cápsulas contendo apenas farinha de *V. unguiculata*; e células de *C. violaceum* nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 1,0%. Cada tratamento continha 30 cápsulas, infestadas com 30 insetos do Ceará.

5.1.6 Bioensaio III

A estirpe padrão de *C. violaceum* ATCC 12472 foi cultivada em 500 mL de caldo nutritivo, e incubada a 30 °C, sob agitação constante a 180 rpm, por 72 horas. Em seguida, foram transferidos 5 mL da pré-cultura para 500 ml de caldo nutritivo, e o meio foi incubado a 30 °C com agitação orbital vigorosa (180 rpm) por 48 horas. Alíquotas da cultura foram coletadas após 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas de cultivo, para eletroforeses em gel de poliacrilamida. As células foram coletadas por centrifugação a 10000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi decantado, congelado em N₂ líquido, dialisado exaustivamente contra água destilada, e posteriormente liofilizado. Essa fração foi denominada “Extrato Secretado” (ES).

As células foram ressuspensas em tampão de lise, na proporção de 1/10 do volume inicial da cultura (50 mL). Em seguida, foi adicionada lisozima para uma concentração final de 100 µg/mL, seguido de 1/10 do volume total de Triton X-100 1%. O material foi incubado em banho-maria por cerca de 1 h à temperatura de 37 °C, até ocorrer a lise das células (desenvolvimento de viscosidade). O DNA genômico foi digerido com a adição de DNase I, para uma concentração final de 20 µg/g de células, de MgCl₂ para uma concentração final de 8 mM e de CaCl₂ para uma concentração final de 10 mM.

O lisado obtido após a digestão do DNA genômico foi incubado a 37 °C até o desaparecimento da viscosidade, centrifugado a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C, e em seguida foi realizada uma nova centrifugação por 20 minutos a 15000 x g, na mesma temperatura. O sobrenadante obtido foi dialisado exaustivamente contra água, congelado em N₂ líquido e liofilizado. Essa fração foi denominada “Extrato Total Solúvel” (ETS). O precipitado foi ressuspenso em água destilada, dialisado exaustivamente contra água destilada, congelado em N₂ líquido e liofilizado (Figura 8). Essa fração foi denominada “Extrato Total Insolúvel” (ETI). Todo o procedimento foi repetido até a obtenção de

quantidades suficientes das frações para a incorporação nas cápsulas destinadas ao bioensaio. As frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%.

O ensaio biológico foi conduzido com 26 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos consistiram de 2 controles com cápsulas contendo apenas farinha de *V. unguiculata*, um deles infestado com insetos do Ceará e o outro infestado com insetos do Rio Grande do Norte; cápsulas contendo o “extrato secretado” de células de *C. violaceum* nas concentrações de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%, infestadas com insetos do Ceará; cápsulas com o “extrato total solúvel” de células de *C. violaceum* nas concentrações de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%, infestadas com insetos do Ceará; cápsulas contendo o “extrato total insolúvel” de células de *C. violaceum* nas concentrações de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%, infestadas com insetos do Ceará; cápsulas de tratamentos similares foram infestadas com insetos oriundos do Rio Grande do Norte. Foram acrescentados 40 insetos em cada tratamento contendo 30 cápsulas destinadas à infestação com insetos do Ceará, e 30 insetos em cada tratamento contendo 20 cápsulas destinadas à infestação com insetos do Rio Grande do Norte. Os adultos emergidos das sementes artificiais foram contados e pesados diariamente, e dois casais dos controles e de cada tratamento com a concentração de 1% foram usados para infestar parcelas correspondentes, contendo 100 sementes de *V. unguiculata* para a avaliação do desempenho dos insetos alimentados com dietas artificiais.

5.2 Clonagem do gene CV1887

5.2.1 Preparação dos meios de cultura

5.2.1.1 Meios Líquidos

Meio 2xYT

Triptona (1,6%), extrato de levedura (1,0%) e NaCl (0,5%) foram dissolvidos em 250 mL de água destilada, e após o pH ser ajustado para 7,0, o volume foi completado para 400 mL com água destilada e o meio esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 20 min a 15 lb/pol². O meio foi resfriado a 50-60 °C e suplementado com estreptomicina para uma concentração final de 30 µg/mL.



FIGURA 8 – Fração de células de *Chromobacterium violaceum* obtida após a lise celular. Extrato Total Insolúvel. Material liofilizado destinado ao bioensaio.

Meio GYT

Triptona (0,125%), extrato de levedura (0,0125%) e glicerol (10%) foram dissolvidos em 10 mL e autoclavados a 121 °C por 20 min a 15 lb/pol².

Meio Caldo Nutritivo

Extrato de carne (3g/L) e peptona (5 g/L) foram dissolvidos em 500 mL e autoclavados a 121 °C por 20 min a 15 lb/pol².

Meio SOB

Triptona (2,0%), extrato de levedura (0,5%) e NaCl (0,05%) foram dissolvidos em 600 mL de água destilada, e após a adição de KCl para uma concentração final de 2,5 mM, o pH foi ajustado para 7,5. O volume foi completado para 1000 mL com água destilada e o meio esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 20 min a 15 lb/pol². O meio foi resfriado a 50-60 °C e suplementado com MgCl₂, esterilizado por filtração, para uma concentração final de 0,01 M, estreptomicina para uma concentração final de 30 µg/mL e ampicilina (concentração final: 50 µg/mL) ou carbenicilina (concentração final: 100 µg/mL).

Meio SOC

Foram adicionados 40 µL de glucose 20% (esterilizada por filtração) a 1 mL de meio SOB.

Meio LB caldo (*Luria-Bertani*)

A mistura de peptona caseína, extrato de levedura e cloreto de sódio da *USB Corporation* (Cleveland, OH, USA), foi dissolvida em água destilada na proporção de 20 g/L, de acordo com a recomendação do fabricante, e o meio foi esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 20 min a 15 lb/pol². O meio foi resfriado a 50-60 °C e suplementado com ampicilina para uma concentração final de 100 µg/mL.

5.2.1.2 Meio Contendo Agar

LB agar

A mistura de peptona caseína, extrato de levedura, cloreto de sódio e agar da *USB Corporation* (Cleveland, OH, USA), foi dissolvida em água destilada na proporção de 35 g/L, de acordo com a recomendação do fabricante, e o meio foi esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 20 min a 15 lb/pol². Em seguida, foi resfriado a 50-60 °C e suplementado com estreptomicina, para uma concentração final de 30 µg/mL, e com ampicilina ou carbenicilina, para uma concentração final de 100 µg/mL. Após homogeneização, cerca de 30 mL foram dispensados em placas de Petri estéreis (100 x 200 mm) e o meio permaneceu por cerca de 30 minutos a uma temperatura em torno de 27 °C, até solidificar. As placas foram então invertidas e estocadas a 4 °C até o uso.

5.2.2 Preparação de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o protocolo fornecido pelo prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro – UNESP/Jaboticabal – descrito a seguir: uma colônia isolada de *E. coli* DH10B ou *E. coli* TOP10 foi inoculada em meio 2xYT. O inóculo foi incubado a 37 °C, com agitação constante (250 rpm), por um período de aproximadamente 16 horas. Depois de observado o crescimento, uma alíquota de 2,0 mL do pré-inóculo foi transferida para 200 mL de meio 2xYT estéril. A nova cultura foi incubada nas mesmas condições anteriormente descritas, até que uma densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,6 fosse obtida, quando então o balão de Erlenmeyer foi colocado em banho de gelo por 30 minutos. Ao final do período de incubação, a suspensão de células foi centrifugada a 1.500 x g, por 5 minutos a 4 °C, numa centrífuga de bancada Eppendorf 5819R, para coleta das células. O precipitado foi lavado em solução de glicerol 10% estéril gelada. Essa etapa de centrifugação e lavagem foi repetida, e então o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de meio GYT. As células foram armazenadas em *freezer* a -80 °C até o momento da transformação.

5.2.3 Extração do DNA genômico de *Chromobacterium violaceum*

A estirpe ATCC 12472 da *C. violaceum* foi inoculada em meio caldo nutritivo, e após o cultivo, foram preparadas culturas estoques da bactéria em glicerol 10%, e os estoques foram mantidos em *freezer* a -80 °C.

O DNA genômico foi isolado de células viáveis de *C. violaceum* utilizando-se o método baseado no detergente brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações que se mostraram adequadas para obtenção de melhores resultados. Um volume de 1,9 mL da cultura bacteriana foi transferido para microtubos de 2,0 mL, os quais foram centrifugados por 5 min a 12.000 rpm (centrífuga para microtubos, MiniSpin – Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e, em seguida, as células foram lavadas com 800 µL de água ultra pura estéril. Foram então adicionados 800 µL de tampão CTAB 2% (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; pré-aquecido a 60 °C, contendo β-mercaptoetanol 0,2% v/v). Em seguida, os tubos foram incubados por 3 horas em banho-maria a 60 °C. Após o período de incubação, foram adicionados à suspensão 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram centrifugados por 30 min a 12.000 rpm e a fase aquosa superior, aproximadamente 700 µL, foi transferida para um novo microtubo. Em seguida, foram adicionados 2/3 do volume obtido de isopropanol 100%. Os microtubos foram homogeneizados por inversão e incubados em freezer, por um período de aproximadamente 16 horas, e centrifugados por 15 min a 12.000 rpm. O precipitado obtido foi lavado com 400 µL de etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM), contendo RNase A 20 µg/mL. A concentração do DNA foi estimada por meio da absorbância em 260 nm (A_{260}), de acordo com a seguinte equação: $[DNA] \text{ ng}/\mu\text{L} = 50 \times F \times A_{260}$, onde $[DNA]$ é a concentração do DNA em ng/µL e F é o fator de diluição.

5.2.4 Amplificação do gene CV1887

Foram desenhados iniciadores específicos que anelam com a porção 5' e 3' terminal das seqüências alvos, de acordo com a seqüência depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para este gene, de modo que contivessem também sítios para as enzimas de restrição utilizadas (*Bgl*III e *Sna*BI). O iniciador *CV1887-for* continha a seqüência nucleotídica 5'- *AGATCTATGGCGGATAATACGGGA* (em itálico o sítio para a enzima *Bgl*III), enquanto a seqüência nucleotídica do iniciador *CV1887-rev* era 5'- *TACGTAGGGCGACGATTGATGGCC* (em itálico o sítio para a enzima *Sna*BI).

As reações de amplificação da seqüência-alvo seguiram os seguintes parâmetros: para uma reação de 10 µL, foram adicionados 2,0 µL do DNA genômico de *C. violaceum* (na concentração de 500 ng/µL), 1,0 µL do tampão de reação 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 9,0; MgCl₂ 15 mM e KCl 500 mM), 2,0 µL da solução de dNTP's (1,0 mM), 1,0 µL de cada

iniciador (cada um na concentração 5,0 μM), 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase e 2,8 μL de água ultra pura estéril. Para as reações controle, foi adicionado água no lugar do DNA.

Para a amplificação do fragmento CV1887 (de 4.158 pb) correspondente ao gene CV1887, o termociclador *Eppendorf MasterCycler Gradient* foi programado para iniciar a 95 °C por 2 minutos. Esta etapa foi seguida por mais 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 66 °C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72 °C por 4 minutos.

5.2.5 Purificação dos produtos de PCR amplificados e ligação no vetor de clonagem

O vetor de clonagem utilizado, o plasmídeo pGEM-T *Easy* (Figura 9), possui dois marcadores genéticos: um deles é o gene β -lactamase, que confere resistência à ampicilina, e possibilita a seleção de colônias transformadas com o plasmídeo. O outro marcador é o gene da β -galactosidase que confere a habilidade de metabolizar a substância cromogênica *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside* (X-Gal), produzindo um pigmento azul. Como o fragmento de DNA a ser clonado no pGEM-T *Easy* irá interromper a seqüência codificadora da β -galactosidase, as bactérias com o plasmídeo recombinante formarão colônias brancas, enquanto que as não recombinantes formarão colônias azuis, o que permite a seleção das células transformadas.

Confirmada a amplificação do gene, este foi capturado a partir da purificação do gel de agarose, utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, de acordo com as especificações do fabricante. Após a leitura da absorbância a 260 nm dos produtos purificados, foi realizada a ligação entre o inserto e o vetor de clonagem pGEM-T *Easy*, a partir da reação com a T4 DNA ligase, com uma razão molar inserto:vetor de 3:1. A reação (20 μL) foi incubada a 4 °C no termociclador *Eppendorf MasterCycler Gradient* durante 16 horas. Em seguida foi realizada a precipitação da reação de ligação com isopropanol 80%, de acordo com o seguinte protocolo: foi adicionado 50 μL de isopropanol 80% à reação de ligação; após homogeneizada, a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado; ao precipitado, foi adicionado 45 μL de etanol 70% e após centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm (*MiniSpin - Eppendorf*), o sobrenadante foi descartado; após a evaporação do álcool, o precipitado foi ressuspenso em água ultra pura (6 μL).

Os plasmídeos contendo o inserto foram usados para transformar células de *E. coli* DH10B por meio de eletroporação. Uma alíquota de 2,0 μL da solução de plasmídeos

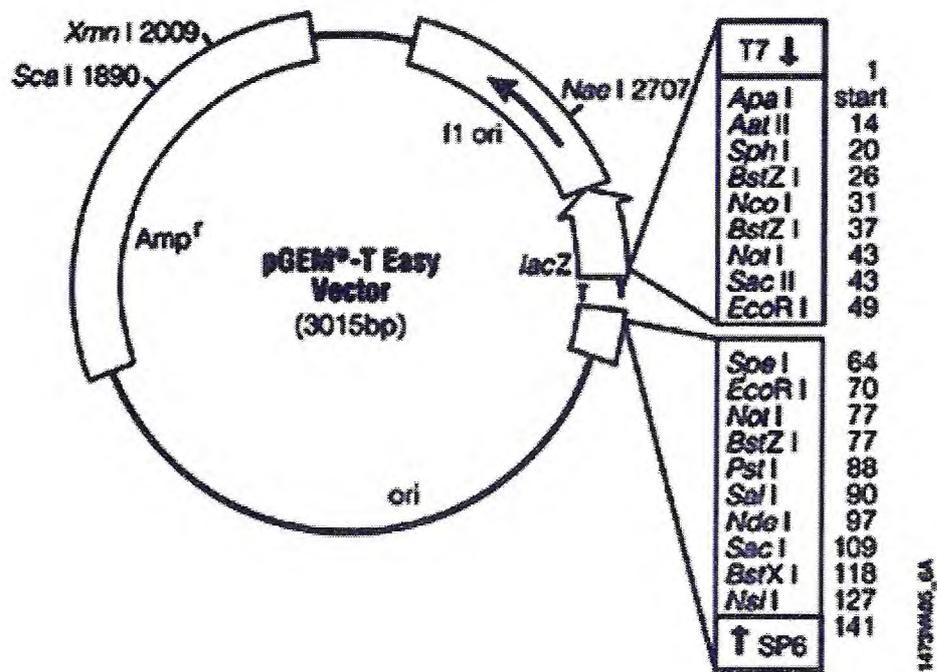


FIGURA 9 – Mapa circular e pontos de referência do vetor de clonagem *pGEM-T Easy Vector Multiple Cloning Sequences*. Fonte: www.promega.com (23/04/2007).

transformados foi utilizada para transformar 50 µL da suspensão de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, em cubetas (*Eppendorf*) com espaço interno de 2 mm. Como controle, água foi adicionada às células no lugar da reação de ligação. As cubetas foram submetidas a um pulso de 2,5 kV no eletroporador *Eppendorf* modelo 2510.

As células transformadas foram suspensas em meio SOC e incubadas a 37 °C por 40 minutos, sob agitação orbital a 150 rpm. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri contendo LB agar com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL), X-Gal (80 µg/mL) e IPTG (0,5 mM). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, durante 16 horas, e os clones selecionados foram submetidos à extração do DNA plasmidial.

5.2.6 Extração do DNA plasmidial

Duas colônias azuis e oito colônias brancas de *E. coli* DH10B obtidas a partir da etapa de clonagem descrita no item anterior, foram submetidas à extração do DNA plasmidial, de acordo com o método de lise alcalina (SAMBROOK, 1989), com algumas modificações, como descrito a seguir: após a visualização de turbidez nos meios de cultura, uma alíquota de 1,0 mL de cada suspensão foi coletada e centrifugada a 12.000 rpm, por 3 minutos (*MiniSpin - Eppendorf*); após a centrifugação, as células foram coletadas e ressuspensas em 100 µL de solução GET (Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0). Em seguida foi feita a adição de 200 µL da solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,4 M) e após 3 minutos, foram adicionados 150 µL da solução de neutralização (acetato de potássio 3 M, ácido acético glacial 5 M); as amostras foram mantidas em banho de gelo por 5 minutos e então centrifugadas por mais 5 minutos a 12.000 rpm (*MiniSpin - Eppendorf*); o sobrenadante foi coletado em novos tubos, e então foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA, que permaneceu incubado no freezer por duas horas; as amostras foram recentrifugadas e o sobrenadante foi descartado; Após a etapa de lavagem com etanol 70%, o precipitado foi ressuspense em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0), contendo RNase A 20 µg/mL.

Em seguida, foi realizada uma reação de amplificação a partir dos plasmídeos extraídos das 8 colônias transformadas para confirmar a eficiência da clonagem. Os clones transformados e confirmados por PCR foram mantidos em meio-agar-estoque em camada alta (sob refrigeração a 4 °C) e estocados em glicerol (a -20 °C).

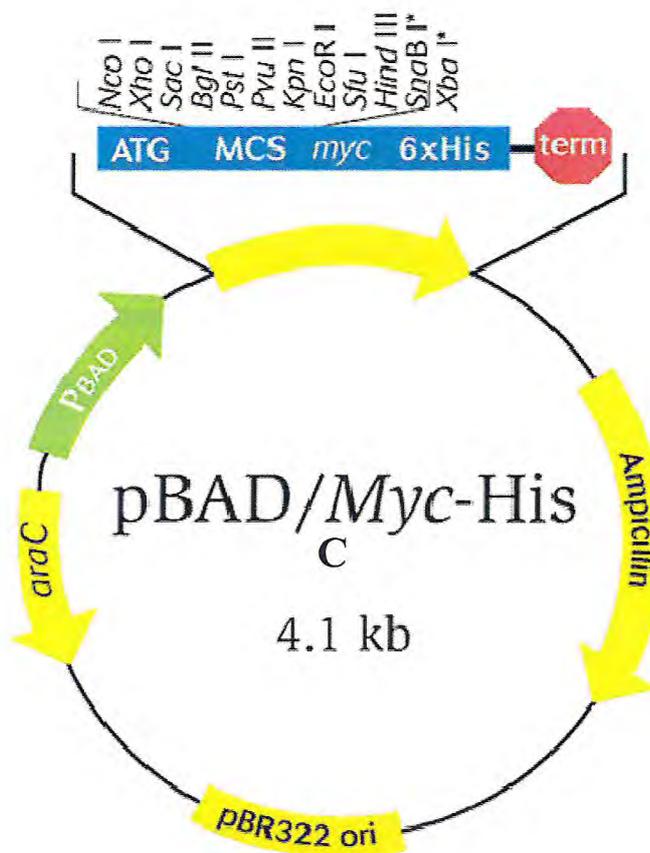
5.2.7 Subclonagem do gene CV1887 para o vetor de expressão

O vetor de expressão utilizado, o plasmídeo pBAD/*Myc*-His C (Figura 10), também possui o gene β -lactamase, que confere resistência à ampicilina. Os genes clonados nesse vetor estão sob o controle do promotor *araBAD* (P_{BAD}). A expressão da proteína recombinante é induzida fornecendo-se L-arabinose e os níveis de expressão variam em função da dose de L-arabinose utilizada. Outra característica do vetor pBAD/*Myc*-His C é a expressão das proteínas recombinantes na forma de uma proteína de fusão, possuindo uma cauda de 6 resíduos de histidina consecutivos na sua extremidade N-terminal. Isso possibilita a purificação da proteína por meio de cromatografia de afinidade na qual os resíduos de histidina interagem por coordenação com átomos de níquel imobilizados em uma resina. O plasmídeo possui ainda na porção C-terminal do seu sítio múltiplo de clonagem uma região que codifica para o epítipo *c-myc*, que permite a detecção da proteína de fusão com o anticorpo *anti-myc*.

O plasmídeo pGEM-T *Easy* contendo o inserto CV1887 e o plasmídeo pBAD/*Myc*-His C foram utilizados como substratos para reações de digestão enzimáticas. A primeira reação foi realizada utilizando-se a enzima *SnaBI*, nas seguintes condições: Bis Tris propano-HCl 10 mM pH 7,0, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM e BSA 100 μ g/mL. A reação foi incubada no termociclador *Eppendorf MasterCycler Gradient* por 3 horas a 37 °C. Decorrido o tempo da primeira reação, foram adicionados os reagentes necessários para dar prosseguimento à segunda reação de digestão com a enzima *BglII*, nas seguintes condições: NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,9, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM e BSA 100 μ g/mL, seguidos de mais três horas a 37 °C. Após o término da reação de digestão com as enzimas de restrição, procedeu-se à purificação dos fragmentos digeridos utilizando o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, de acordo com as especificações do fabricante.

Confirmada a digestão e purificação do fragmento correspondente ao gene CV1887 e do plasmídeo pBAD/*Myc*-His C por eletroforese, foi realizada a reação de ligação entre o inserto e o vetor de expressão com a enzima T₄ DNA ligase, de acordo com instruções do fornecedor da enzima. Para a reação de ligação foi usada uma razão molar entre vetor:inserto de 1:5. A reação de ligação foi precipitada com isopropanol 80%, de acordo com o protocolo descrito no item 5.2.5.

A eletroporação foi realizada com a adição de 3 μ L da solução de plasmídeo em 60 μ L de células de *E. coli* TOP10. A suspensão de células adicionada à solução de plasmídeo foi transferida para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada, com espaço interno de



* Frame-dependent variations

FIGURA 10 – Características do vetor de expressão pBAD/Myc-His. Fonte: www.invitrogen.com (23/04/2007).

2,0 mm e submetidas a um pulso de 2,5 kV, num eletroporador *Eppendorf*, modelo 2510. Para uma reação controle, as células da bactéria foram eletroporadas com água no lugar do plasmídeo recombinante. Imediatamente, após o pulso, foi adicionado à suspensão 1,0 mL do meio SOC e as células foram transferidas para tubos *Falcon* de 15 mL.

As células transformadas foram mantidas sob agitação a 150 rpm por 90 minutos a 30 °C. Após o período de incubação, 100 µL da cultura de células transformadas foram semeadas em placas de Petri (90 mm) contendo meio LB agar acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL). As placas foram mantidas a 37 °C por 24 horas, quando foram avaliadas quanto à ocorrência de colônias. Essas colônias foram inoculadas em 5,0 mL de meio LB caldo (contendo ampicilina 100 µg/mL e estreptomicina 30 µg/mL) e mantidas sob agitação constante (150 rpm) a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

A eficiência da transformação foi confirmada pela realização de uma reação de PCR, utilizando-se como substrato da reação o DNA plasmidial da bactéria recombinante. Para isso, colônias selecionadas ao acaso foram submetidas ao procedimento de isolamento de DNA plasmidial, de acordo com a metodologia descrita por Sambrook (1989), detalhada no item 5.2.6.

5.2.8 Eletroforeses em gel de agarose

A análise da qualidade do DNA extraído, da eficiência da extração de plasmídeos, bem como dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene CV1887, foi realizada por meio de eletroforeses em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL. O procedimento consistiu em adicionar 5,0 µL das amostras a 2,0 µL de tampão de amostra (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25% em TE pH 8,0) e aplicados nos géis de agarose. As eletroforeses foram conduzidas com amperagem constante (100 mA), em uma fonte Pharmacia LKB GPS 200/400, num sistema horizontal, com o gel submerso em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1,0 mM pH 8,0).

5.3 Indução de expressão da proteína recombinante codificada pelo gene CV1887

5.3.1 Indução das células de *E. coli* TOP10 utilizadas como controle

Para a obtenção de amostras utilizadas como controle na indução de expressão da proteína recombinante codificada pelo gene CV1887 foram utilizadas células de *E. coli* TOP10, células de *E. coli* TOP10 contendo o plasmídeo pBAD/*Myc*-His C e células de *E. coli* TOP10 contendo o plasmídeo pBAD/*Myc*-His/*lacZ* (Figura 11), que contém o gene

para β -galactosidase fusionado com o peptídeo C-terminal. O vetor expressa uma proteína de 120 kDa, após indução com L-arabinose. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, sendo uma delas destinada à indução com L-arabinose e a outra representando a cultura não-induzida.

As células foram plaqueadas em meio LB agar e colônias isoladas foram utilizadas para o pré-inóculo, realizado em meio SOB contendo ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para as células transformadas com o plasmídeo. As células de *E. coli* TOP10 sem o plasmídeo foram cultivadas em meio SOB sem ampicilina. Os pré-inóculos foram incubados sob agitação orbital a 225 rpm, 37 °C, por 16 horas. Os inóculos foram realizados em meio SOB (com as mesmas características descritas para cada tipo de célula) a partir de 200 μL dos pré-inóculos adicionados a 20 mL de meio SOB. Após 1:30 h a leitura da densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) foi realizada, e uma vez atingida uma OD_{600} em torno de 0,5 foram adicionadas alíquotas de L-arabinose para uma concentração final de 0,2% às culturas destinadas à indução. Alíquotas de 1 mL foram coletadas de cada cultura, centrifugadas a 12000 rpm por 10 min, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados, correspondentes ao tempo zero da indução, foram armazenados a 4 °C. O restante da cultura foi incubado sob agitação orbital a 225 rpm, 37 °C, por 4 horas e alíquotas de 1 mL foram coletadas, centrifugadas a 12000 rpm por 10 min, os sobrenadantes descartados e os precipitados correspondentes ao tempo de 4 horas após a indução foram armazenados em freezer a 4 °C. O restante das culturas foi centrifugado nas mesmas condições e os precipitados foram destinados à lise celular.

5.3.2 Determinação da concentração ideal de L-arabinose para a indução

O clone de *E. coli* TOP10 recombinante, portando o gene CV1887, foi analisado em relação à capacidade de expressão da proteína recombinante codificada pelo referido gene. A indução da expressão da proteína recombinante foi realizada como uma indução piloto para definir qual a concentração de L-arabinose mais efetiva na indução da proteína em questão. Essa indução piloto foi feita de acordo com as instruções obtidas no manual do vetor de expressão pBAD/*Myc*-Hist C.

Foi utilizado um dos clones da célula TOP10 transformada com o vetor de expressão pBAD-C (pBADC::CV1887). Um pré-inóculo foi preparado a partir de colônias isoladas em placa de petri com meio LB agar contendo os antibióticos carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e estreptomicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que foi inoculado em 3 mL de meio SOB, e depois

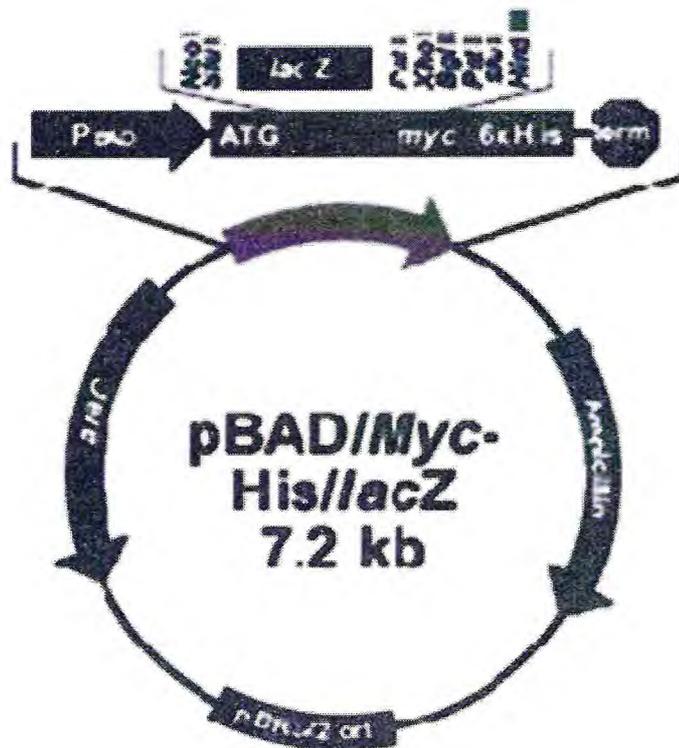


FIGURA 11 – Características do vetor de expressão pBAD/Myc-His/lacZ. Fonte: www.invitrogen.com (24/04/2007).

incubado a 37 °C sob agitação constante (200 rpm), durante 16 horas. Em seguida, uma alíquota de 50 µL do pré-inóculo foi retirada para a preparação do inóculo, realizado em 5 mL de meio SOB. As células foram incubadas novamente por duas horas, a 37 °C, sob agitação constante (225 rpm). A leitura da densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) da cultura foi monitorada e, após a leitura ficar em torno de 0,5, adicionou-se às células diferentes concentrações de L-arabinose (0,002%, 0,02%, 0,2% e 2%). Após a adição da L-arabinose, foi retirada uma alíquota de 1 mL das células recombinantes. Estas células foram coletadas por centrifugação e armazenadas a 4 °C. A cultura de células restante foi incubada a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm) por quatro horas. Após as 4 h, retirou-se novamente uma alíquota de 1 mL das células recombinantes, sendo essas coletadas por centrifugação e armazenadas a 4 °C. O mesmo procedimento foi realizado para os 3 mL restantes das culturas, que foram destinados à lise celular. Considerou-se, portanto, apenas dois tempos de indução, o tempo zero e o de quatro horas.

5.3.3 Lise das células de *E. coli* induzidas

A lise das células armazenadas após as induções descritas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Nogueira (1999). As células foram suspensas em 1/10 do volume original em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M). Foi adicionado lisozima para uma concentração final de 100 µg/mL, seguida de 1/10 do volume de Triton X-100 1% (v/v). A suspensão foi então incubada a 30 °C em banho-maria por 15-30 minutos até ocorrer a lise das células (desenvolvimento de viscosidade).

Uma vez observada a viscosidade do material lisado, foi conduzida a digestão do DNA genômico bacteriano adicionando ao lisado DNase I (para uma concentração final de 20 µg/g de células), com a adição concomitante de MgCl₂ para uma concentração final de 8 mM e de CaCl₂ para uma concentração final de 10 mM. O lisado foi incubado a 30 °C até a perda total da viscosidade, sendo em seguida centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um frasco limpo, correspondendo à “Fração Solúvel” e o precipitado foi armazenado a 4 °C, correspondendo à “Fração Insolúvel”.

5.3.4 Eletroforeses de proteínas em gel de poliacrilamida

A eficiência da indução de expressão do gene CV1887 foi avaliada por eletroforeses em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol, conduzidas de acordo com a técnica descrita por Laemli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas de vidro. O gel de separação, contendo uma concentração final de poliacrilamida de 8,5% (m/v), foi montado de acordo com o seguinte protocolo (para um volume total de 25 mL de gel):

Acrilamida : bis-acrilamida (30 : 0,8%)	7,080 mL
Tris-HCl 3 M, pH 8,8	3,125 mL
SDS 10% (m/v)	0,250 mL
Persulfato de amônio 1,5% (m/v)	1,250 mL
Água destilada	13,280 mL
TEMED	12,500 mL

A montagem do gel de separação com uma concentração final de poliacrilamida 12,5% (m/v), seguiu o seguinte protocolo (para um volume total de 25 mL):

Acrilamida : bis-acrilamida (30 : 0,8%)	10,25 mL
Tris-HCl 3 M, pH 8,8	3,125 mL
SDS 10% (m/v)	0,250 mL
Persulfato de amônio 1,5% (m/v)	1,250 mL
Água destilada	13,280 mL
TEMED	12,500 mL

Após a polimerização, o gel de aplicação, contendo uma concentração final de poli(acrilamida de 3,5% (m/v), foi montado de acordo com o seguinte protocolo (para um volume final de 10 mL de gel):

Acrilamida : bis-acrilamida (30 : 0,8%)	1,24 mL
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,50 mL
SDS 10% (m/v)	0,10 mL
Persulfato de amônio 1,5% (m/v)	0,50 mL
Água destilada	5,64 mL
TEMED	10,00 mL

Os precipitados de células das amostras coletadas a partir de 1 mL das culturas induzidas como descrito nos itens 5.1.1 e 5.2.2, foram suspensos em 100 µL de tampão de amostra 1x (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 2%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,002%). Os precipitados oriundos de lise celular foram suspensos em 200 µL do tampão de amostra descrito, e aos sobrenadantes obtidos no mesmo procedimento foi adicionado ¼ do volume inicial de tampão de amostra 4x. As amostras foram incubadas a 100 °C por 10 minutos e centrifugadas a 15000 x g por 5 minutos. A aplicação no gel de concentração foi efetuada com alíquotas de 20 µL das amostras. Para as amostras liofilizadas de culturas de *C. violaceum* e *E. coli*, e de frações obtidas a partir da lise das células de *C. violaceum* e *E. coli*, testadas nos bioensaios descritos a seguir, foi utilizada uma concentração de 10 mg/mL do tampão de amostra.

A corrida eletroforética foi realizada com o gel imerso em tampão de corrida para SDS-PAGE (Tris-HCl 0,25 M, pH 8,3; Glicina 1,92 M e SDS 1,0%), sob amperagem constante, nas seguintes condições: 100 V; 35 mA; e 50 W (*Electrophoresis Power Supply*, EPS 601. Amersham Biosciences, San Francisco, CA, USA). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue R-350 0,1%, preparada em metanol 30%, ácido acético 10% e água destilada, e descorados para a visualização das bandas protéicas em solução com isopropanol 12,5%, ácido acético 10% e água destilada.

5.3.5 Bioensaio IV

Células de *E. coli* TOP10, transformadas com o plasmídeo pBAD/*Myc*-His C portando o gene CV1887, foram semeadas em placas de petri com meio LB agar contendo estreptomicina (30 µg/mL) e carbenicilina (100 µg/mL) a partir de culturas estoque em glicerol. Colônias isoladas foram utilizadas para a realização do pré-inóculo em 10 mL de meio SOB, contendo os antibióticos estreptomicina (30 µg/mL) e carbenicilina (100 µg/mL). Os pré-inóculos foram incubados a 225 rpm, 37 °C, durante 16 h.

Após decorridas as 16 h, as culturas foram inoculadas em 1 litro de meio SOB contendo os antibióticos citados, incubadas nas mesmas condições descritas e a leitura da OD₆₀₀ foi realizada. Uma vez atingida uma OD₆₀₀ de 0,5, foram adicionadas alíquotas de L-arabinose para uma concentração final de 0,2%. As culturas foram incubadas a 225 rpm, 37 °C, por 4 horas, centrifugadas a 4 °C, e os precipitados foram submetidos à lise celular, de acordo com o protocolo descrito por Nogueira (1999). Os lisados foram liofilizados e incorporados em sementes artificiais nas proporções adequadas.

O ensaio biológico foi conduzido com 11 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos consistiram de cápsulas contendo apenas farinha de *V. unguiculata* como controle; violaceína nas concentrações de 0,125%, 0,25% e 0,5%; células de *E. coli* TOP10 contendo o plasmídeo pBAD-C nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 4,0%; e células de *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo pBAD-C contendo o inserto CV1887, nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 4,0%.

6 RESULTADOS

6.1 Análise *in silico*

As buscas por similaridade, onde se comparou por meio do programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), a proteína codificada pelo gene CV1887 com proteínas de outros organismos, com seqüências depositadas em bancos públicos de seqüências, revelou os resultados descritos na Tabela 1. Nessa tabela observou-se os organismos cujas proteínas apresentaram maiores similaridades com a proteína codificada pelo gene CV1887, considerando-se um escore para o alinhamento igual ou maior que 200. A primeira proteína foi a proteína nematicida produzida por *X. bovienii*, a segunda e a terceira foram proteínas com repetições YD produzidas por *Pseudomonas syringae*, e a quarta e quinta foram proteínas com atividade inseticida produzidas por *P. luminescens*.

TABELA 1 - Organismos cujas proteínas apresentaram maiores similaridades com a proteína codificada pelo gene CV1887 (align score - 200).

ORGANISMO	PROTEÍNA	SCORE	E value
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	Nematicidal protein 2	548 bits	4 e ⁻¹⁵⁴
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	YD repeat protein	423 bits	2 e ⁻¹¹⁶
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	YD repeat protein	419 bits	3 e ⁻¹¹⁵
<i>Photorhabdus luminescens</i> <i>subsp. laumondii</i> TTO1	Hypotetical protein plu2222	360 bits	2 e ⁻⁹⁷
<i>Photorhabdus luminescens</i> <i>subsp. laumondii</i> TTO1	Hypotetical protein plu 2442	366 bits	3 e ⁻⁹⁹

6.2 Avaliação da atividade inseticida de *C. violaceum* sobre larvas de *C. maculatus*

6.2.1 Bioensaio I

A Tabela 2 mostra os valores obtidos para cada variável relacionada com o desenvolvimento dos insetos criados no Ceará em cápsulas artificiais contendo células íntegras de *C. violaceum*. As frações não causaram mortalidade em larvas de *C. maculatus*, uma vez que não observamos diferenças significativas no percentual de emergência dos

insetos do Ceará, quando alimentados com cápsulas contendo a bactéria. No entanto, os tratamentos contendo células da *C. violaceum* nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/p), retardaram significativamente o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará. As células de *C. violaceum* na concentração de 0,5% também reduziram significativamente o peso dos insetos do Ceará recém-emergidos.

Quando o desempenho da progênie desses insetos foi avaliado em sementes de *V. unguiculata*, não foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos (Tabela 3).

TABELA 2 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará em dietas artificiais contendo células de *C. violaceum* íntegras.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	25,84 ± 0,39 c	69,90 ± 5,11 a	3,44 ± 0,07 a
0,25%	26,85 ± 0,46 bc	63,28 ± 10,04 a	3,35 ± 0,09 ab
0,5%	28,23 ± 0,58 a	58,46 ± 13,32 a	3,04 ± 0,09 b
1,0%	27,83 ± 0,13 ab	67,65 ± 5,23 a	3,10 ± 0,08 ab
2,0%	28,72 ± 0,27 a	66,45 ± 6,25 a	3,18 ± 0,21 ab

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

TABELA 3 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Número de Ovos por Fêmea dos insetos do Ceará criados em sementes de *V. unguiculata*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	NO/F ³
0%	30,02 ± 0,30 a	87,60 ± 2,604 a	63,16 ± 6,19 a
0,25%	30,24 ± 1,69 a	87,00 ± 9,381 a	68,00 ± 4,26 a
0,5%	31,22 ± 0,43 a	94,60 ± 4,089 a	71,00 ± 7,48 a
1,0%	31,10 ± 0,32 a	90,00 ± 4,609 a	65,33 ± 3,47 a
2,0%	29,63 ± 0,04 a	87,80 ± 3,064 a	68,16 ± 2,89 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ Número de ovos por fêmea.

A Tabela 4 sumariza os resultados obtidos para cada variável testada com os insetos do Rio Grande Norte, alimentados com cápsulas contendo células íntegras de *C. violaceum* em diferentes proporções. Para esses insetos, não observamos diferenças significativas em nenhuma das concentrações de *C. violaceum* testadas.

TABELA 4 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte em dietas contendo células íntegras de *Chromobacterium violaceum*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	27,80 ± 0,41 a	73,03 ± 8,25 a	3,28 ± 0,09 a
0,25%	28,45 ± 0,43 a	82,03 ± 2,61 a	3,15 ± 0,16 a
0,5%	28,42 ± 0,41 a	83,78 ± 7,16 a	3,13 ± 0,11 a
1,0%	27,70 ± 0,38 a	91,78 ± 4,13 a	3,19 ± 0,06 a
2,0%	28,63 ± 0,54 a	82,33 ± 6,03 a	3,18 ± 0,08 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

O desempenho dos insetos do Rio Grande do Norte alimentados com sementes de *V. unguiculata* foi igual para todos os tratamentos. Não encontramos diferenças significativas entre os valores obtidos com a progênie dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes de *V. unguiculata*, em nenhum dos parâmetros testados (Tabela 5).

TABELA 5 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Número de Ovos por Fêmea dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes de *V. unguiculata*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	NO/F ³
0%	30,91 ± 0,30 a	86,10 ± 5,88 a	78,50 ± 6,01 a
0.25%	30,88 ± 0,49 a	83,60 ± 2,978 a	72,33 ± 8,77 a
0.5%	30,97 ± 0,05 a	83,40 ± 0,287 a	69,33 ± 1,64 a
1.0%	31,15 ± 0,31 a	86,50 ± 2,121 a	69,50 ± 4,26 a
2.0%	31,33 ± 0,56 a	82,20 ± 0,822 a	70,00 ± 6,48 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ Número de ovos por fêmea.

Quando comparadas as médias obtidas para cada parâmetro biológico avaliado, entre os insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte, alimentados com dietas artificiais, os resultados apontaram as diferenças registradas na Tabela 6.

TABELA 6 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados em sementes artificiais contendo células de *C. violaceum* íntegras.

Tratamentos ¹	TMD ²	%EM ³	PM ⁴
CvCE 0%	25,84 ± 0,39 c	69,90 ± 5,11 a	3,44 ± 0,07 a
CvRN 0%	27,80 ± 0,41 a	73,03 ± 8,25 a	3,28 ± 0,09 a
CvCE 0,25%	26,85 ± 0,46 bc	63,28 ± 10,04 a	3,35 ± 0,09 ab
CvCE 0,5%	28,23 ± 0,58 a	58,46 ± 13,32 a	3,04 ± 0,09 b
CvCE 1,0%	27,83 ± 0,13 ab	67,65 ± 5,23 a	3,10 ± 0,08 ab
CvCE 2,0%	28,72 ± 0,27 a	66,45 ± 6,25 a	3,18 ± 0,21 ab
CvRN 0,25%	28,45 ± 0,43 a	82,03 ± 2,61 a	3,15 ± 0,16 a
CvRN 0,5%	28,42 ± 0,41 a	83,78 ± 7,16 a	3,13 ± 0,11 a
CvRN 1,0%	27,70 ± 0,38 a	91,78 ± 4,13 a	3,19 ± 0,06 a
CvRN 2,0%	28,63 ± 0,54 a	82,33 ± 6,03 a	3,18 ± 0,08 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ Os tratamentos infestados com insetos do Ceará estão representados como CvCE e os tratamentos infestados com insetos do Rio Grande do Norte estão designados como CvRN.

² O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

³ O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

⁴ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

O desempenho dos insetos do Ceará foi superior à dos insetos do Rio Grande do Norte, quando comparados os tempos médios de desenvolvimento obtidos para os controles e para as frações com a concentração 0,25% (Figura 12).

A fração com 0,5% de células de *C. violaceum* foi mais eficiente em reduzir o peso dos insetos do Rio Grande do Norte (Figura 13). Não foi observada diferença significativa para o percentual de emergência entre os insetos das duas origens.

Os resultados obtidos quando comparamos os insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte, alimentados em sementes de *V. unguiculata*, não apontam diferenças significativas entre esses insetos para nenhuma das variáveis testadas (Tabela 7).

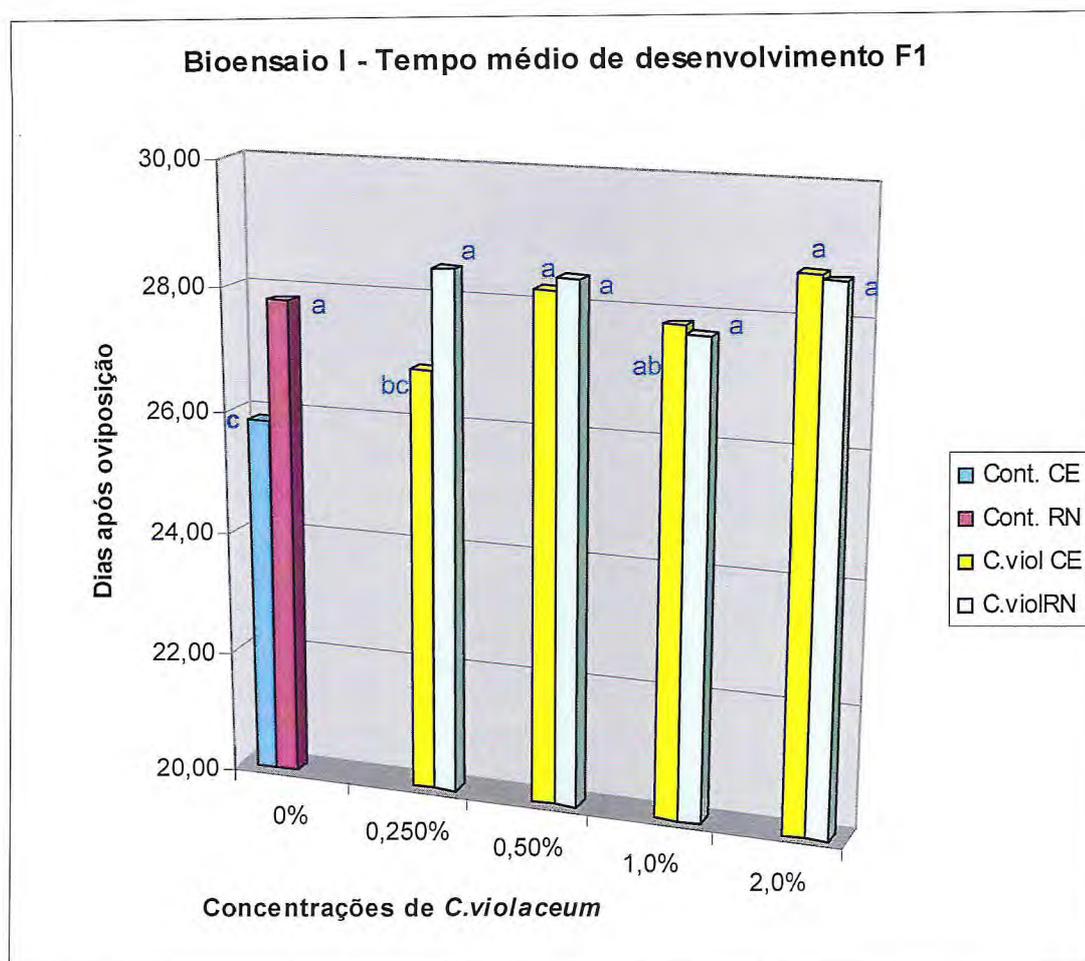


FIGURA 12 – Tempo Médio de Desenvolvimento dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte, alimentados com dietas artificiais contendo células íntegras de *C. violaceum*.

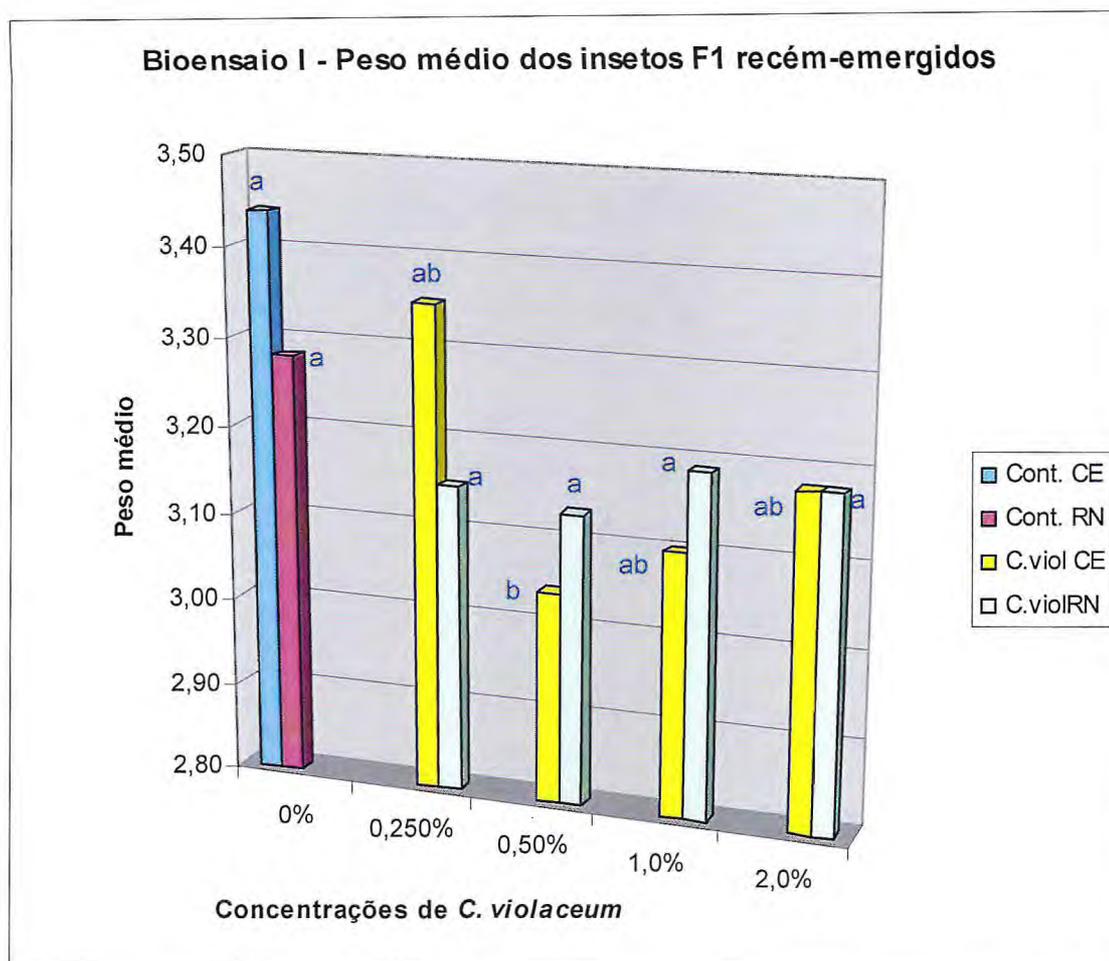


FIGURA 13 - Peso médio dos insetos recém-emergidos do Ceará e do Rio Grande do Norte, alimentados com dietas artificiais contendo células íntegras de *C. violaceum*.

TABELA 7 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Número de Ovos por Fêmea dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte criados em sementes de *Vigna unguiculata*.

Tratamentos ¹	TMD ¹	%EM ²	NO/F ³
CvCE 0%	30,02±0,30 a	87,60 ± 2,604 a	63,16 ± 6,19 a
CvRN 0%	30,91±0,30 a	8,6,10 ± 5,88 a	78,50 ± 6,01 a
CvCE 0,25%	30,24±1,69 a	87,00 ± 9,381 a	68,00 ± 4,26 a
CvCE 0,5%	31,22±0,43 a	94,60 ± 4,089 a	71,00 ± 7,48 a
CvCE 1,0%	31,10±0,32 a	90,00 ± 4,609 a	65,33 ± 3,47 a
CvCE 2,0%	29,63±0,04 a	87,80 ± 3,064 a	68,16 ± 2,89 a
CvRN 0,25%	30,88±0,49 a	83,60 ± 2,978 a	72,33 ± 8,77 a
CvRN 0,5%	30,97±0,05 a	83,40 ± 0,287 a	69,33 ± 1,64 a
CvRN 1,0%	31,15±0,31 a	86,50 ± 2,121 a	69,50 ± 4,26 a
CvRN 2,0%	31,33±0,56 a	82,20 ± 0,822 a	70,00 ± 6,48 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ Os tratamentos infestados com insetos do Ceará estão representados como CvCE e os tratamentos infestados com insetos do Rio Grande do Norte estão designados como CvRN.

² O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

³ O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

⁴ Número de ovos por fêmea.

6.2.2 Bioensaio II

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos com os insetos do Ceará, criados em sementes artificiais contendo células aquecidas a 100 °C por 30 min de *C. violaceum*. Não houve diferenças significativas em relação ao peso médio dos adultos recém-emergidos e ao percentual de emergência desses insetos em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, as células de *C. violaceum* foram capazes de retardar significativamente o tempo de desenvolvimento dos insetos nas três concentrações testadas, sendo a concentração de 1% a mais efetiva (Figura 14).

TABELA 8 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em dietas artificiais com células de *Chromobacterium violaceum* autoclavadas.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	30,94 ± 0,24 a	89,57 ± 1,44 a	3,42 ± 0,03 a
0,1%	34,08 ± 0,36 b	84,78 ± 2,18 a	3,25 ± 0,11 a
0,25%	34,81 ± 0,06 b	88,09 ± 0,97 a	3,17 ± 0,03 a
1,0%	39,24 ± 0,09 c	80,04 ± 1,82 a	2,99 ± 0,05 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

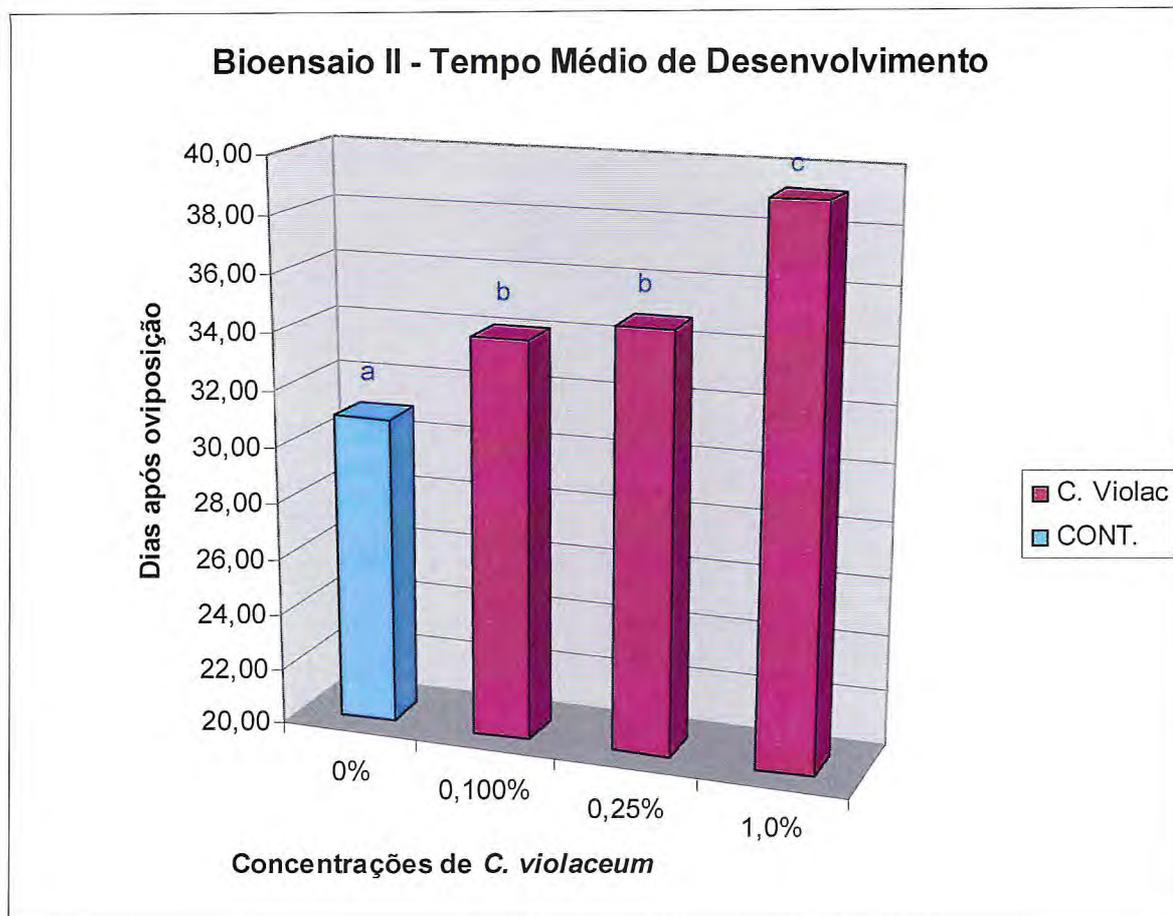


FIGURA 14 – Tempo médio de desenvolvimento dos insetos alimentados em dietas artificiais contendo células de *C. violaceum* aquecidas a 100 °C por 30 min.

6.2.3 Bioensaio III

O extrato total solúvel (ETS) da *C. violaceum* retardou o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará (Tabela 9; Figura 15) e do Rio Grande do Norte (Tabela 10; Figura 16) nas concentrações 0,25%, 0,5% e 1,0%, mas não teve nenhum efeito no peso desses insetos.

TABELA 9 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido a partir da lise de células de *Chromobacterium violaceum*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	28,511 ± 0,647 b	61,972 ± 3,450 ab	3,587 ± 0,144 a
ETS 0,125%	29,878 ± 0,280 ab	82,307 ± 3,718 a	3,321 ± 0,036 a
ETS 0,25%	30,651 ± 1,206 a	62,619 ± 19,651 ab	3,590 ± 0,106 a
ETS 0,5%	30,138 ± 0,155 a	66,705 ± 5,753 ab	3,327 ± 0,064 a
ETS 1,0%	30,887 ± 0,268 a	42,700 ± 9,292 b	3,336 ± 0,211 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

Na concentração de 1,0%, o ETS apresentou o menor percentual de emergência para os insetos do Ceará. No entanto, esse valor não diferiu significativamente do controle. Para essa variável, não foi observada qualquer diferença significativa para os insetos do Rio Grande do Norte.

TABELA 10 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido a partir da lise de células de *Chromobacterium violaceum*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	30,767 ± 0,423 b	71,059 ± 3,248 a	3,163 ± 0,075 a
ETS 0,125%	30,753 ± 0,124 b	63,439 ± 12,676 a	3,086 ± 0,047 a
ETS 0,25%	32,594 ± 1,093 a	61,875 ± 5,217 a	3,146 ± 0,086 a
ETS 0,5%	32,649 ± 0,045 a	60,740 ± 2,846 a	2,995 ± 0,067 a
ETS 1,0%	33,214 ± 0,100 a	62,977 ± 4,159 a	3,044 ± 0,050 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

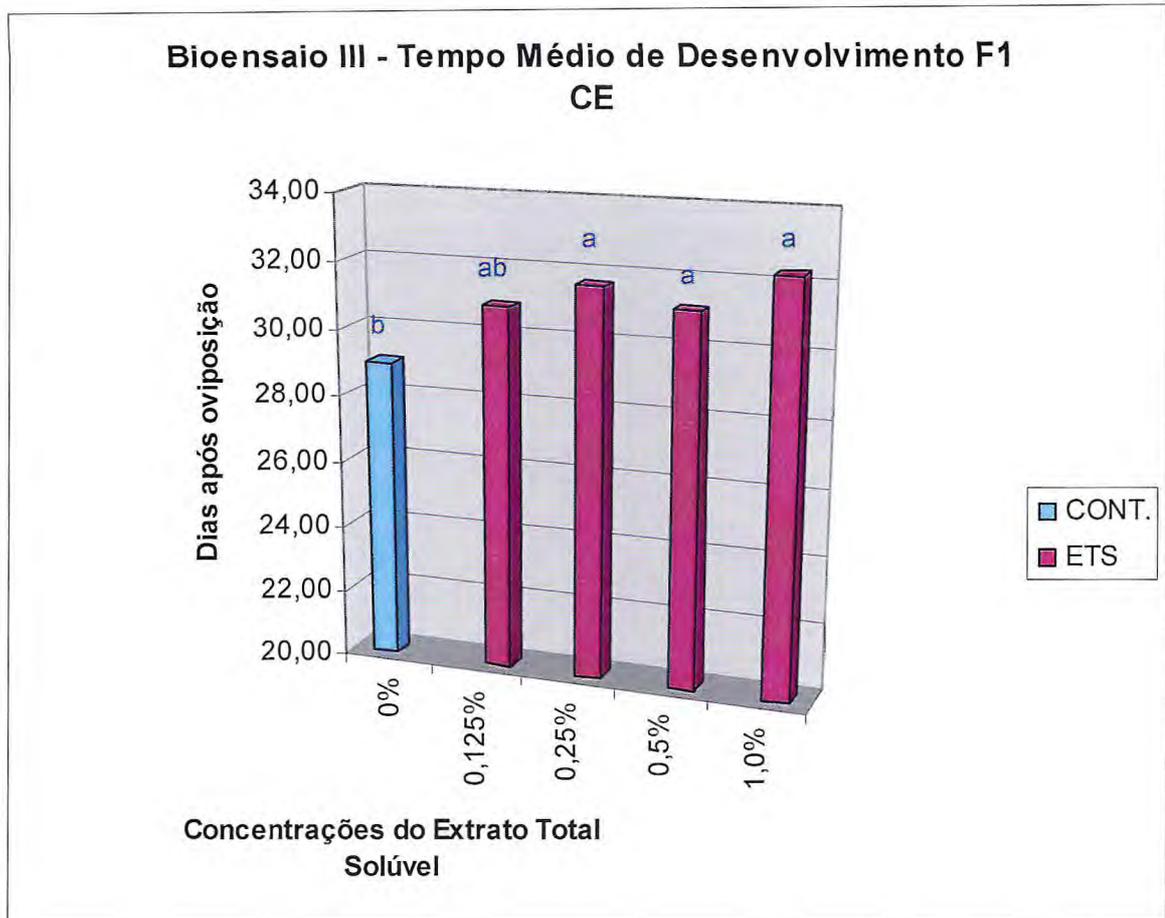


FIGURA 15 – Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Ceará alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido após a lise de células da *Chromobacterium violaceum*.

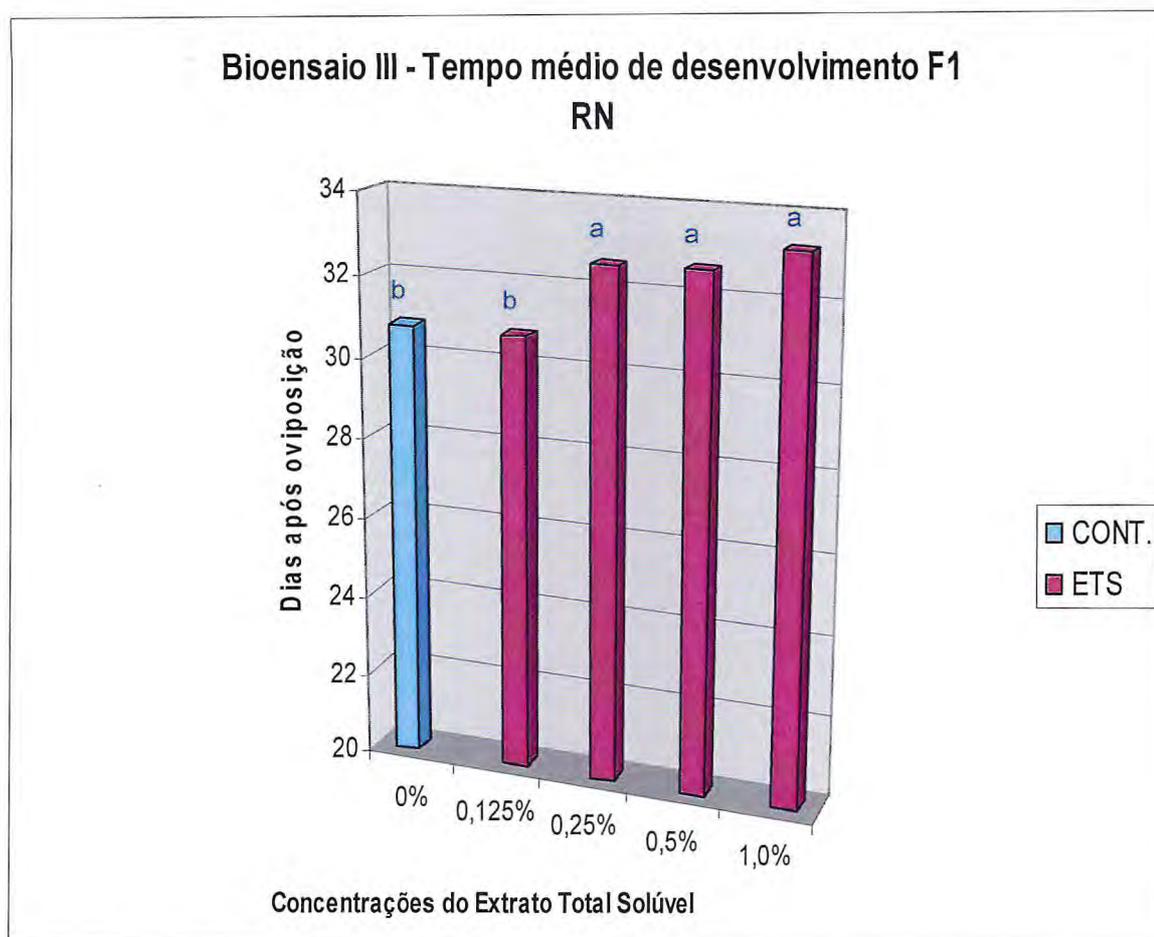


FIGURA 16 - Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte alimentados em sementes artificiais com frações de *Chromobacterium violaceum*.

Os insetos do Rio Grande do Norte foram mais suscetíveis ao Extrato Total Solúvel de *C. violaceum*, em relação aos insetos do Ceará, no que diz respeito ao tempo de desenvolvimento (Tabela 11). Na concentração 1,0%, o Extrato Total Solúvel foi significativamente mais eficiente em retardar o desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte do que em todas as concentrações testadas para os insetos do Ceará (Figura 17). No geral, o desempenho dos insetos do Ceará nas sementes artificiais foi superior à dos insetos do Rio Grande do Norte, desde que o tempo de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte foi significativamente maior, enquanto o peso médio desses insetos foi significativamente menor, quando observamos os controles. No entanto, o efeito do ETS no peso e no percentual de emergência dos insetos das duas origens foi similar.

TABELA 11– Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido a partir da lise de células de *C. violaceum*.

Tratamentos ¹	TMD ²	%EM ³	PM ⁴
CvCE 0%	28,511 ± 0,647 d	61,972 ± 3,450 ab	3,587 ± 0,144 a
CvRN 0%	30,767 ± 0,423 bc	71,059 ± 3,248 ab	3,163 ± 0,075 b
CvCE 0,25%	29,878 ± 0,280 cd	82,307 ± 3,718 a	3,321 ± 0,036 ab
CvCE 0,5%	30,651 ± 1,206 bc	62,619 ± 19,651 ab	3,590 ± 0,106 a
CvCE 1,0%	30,138 ± 0,155 cd	66,705 ± 5,753 ab	3,327 ± 0,064 ab
CvCE 2,0%	30,887 ± 0,268 bc	42,700 ± 9,292 b	3,336 ± 0,211 ab
CvRN 0,25%	30,753 ± 0,124 bc	63,439 ± 12,676 ab	3,086 ± 0,047 b
CvRN 0,5%	32,594 ± 1,093 ab	61,875 ± 5,217 ab	3,146 ± 0,086 b
CvRN 1,0%	32,649 ± 0,045 ab	60,740 ± 2,846 ab	2,995 ± 0,067 b
CvRN 2,0%	33,214 ± 0,100 a	62,977 ± 4,159 ab	3,044 ± 0,050 b

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ Os tratamentos infestados com insetos do Ceará estão representados como CvCE e os tratamentos infestados com insetos do Rio Grande do Norte estão designados como CvRN.

² O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

³ O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

⁴ O peso médio dos adultos está expresso em miligramas.

A fração contendo o material secretado (SEC) no meio de cultura de células de *C. violaceum* retardou o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará, em todas as concentrações testadas, em relação ao controle (Tabela 12; Figura 18).

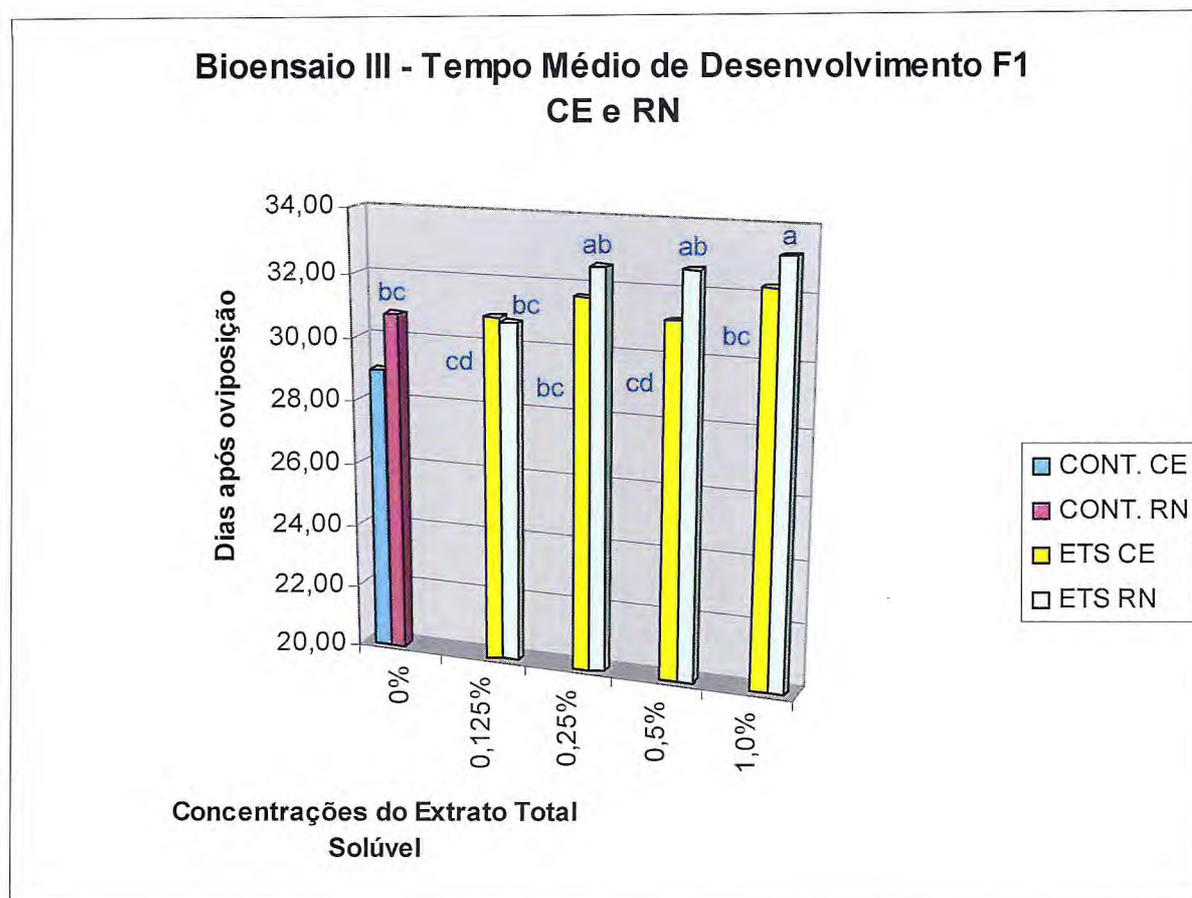


FIGURA 17 – Comparação entre o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte. Insetos alimentados em dietas artificiais contendo o Extrato Total Solúvel obtido após a lise de células de *Chromobacterium violaceum*.

TABELA 12 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em sementes artificiais contendo o material secretado por células de *Chromobacterium violaceum* no meio de cultura.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	28,511 ± 0,647 c	61,972 ± 3,450 b	3,587 ± 0,144 a
SEC 0,125%	29,440 ± 0,106 b	80,881 ± 8,785 a	3,372 ± 0,130 a
SEC 0,25%	30,231 ± 0,340 ab	73,461 ± 5,359 ab	3,340 ± 0,190 a
SEC 0,5%	30,406 ± 0,155 a	70,617 ± 1,755 ab	3,360 ± 0,044 a
SEC 1,0%	29,949 ± 0,166 ab	69,697 ± 3,711 ab	2,888 ± 0,090 b

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

Na concentração de 1,0% essa fração reduziu significativamente o peso desses insetos (Figura 19). A fração SEC não causou mortalidade em larvas de *C. maculatus* do Ceará, já que o menor percentual de emergência foi observado no controle, valor que não difere da maioria daqueles encontrados para os demais tratamentos.

A fração SEC de *C. violaceum* também reduziu o tempo de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte na concentração 1,0%, em relação ao controle (Tabela 13; Figura 20).

TABELA 13 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes artificiais contendo o material secretado por células de *Chromobacterium violaceum* no meio de cultura.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	30,767 ± 0,423 b	71,059 ± 3,248 a	3,163 ± 0,075 ab
SEC 0,125%	32,704 ± 0,780 ab	78,431 ± 15,990 a	3,070 ± 0,157 ab
SEC 0,25%	32,641 ± 0,093 ab	71,699 ± 7,192 a	3,281 ± 0,241 a
SEC 0,5%	32,699 ± 0,999 ab	69,405 ± 2,395 a	2,895 ± 0,079 ab
SEC 1,0%	33,838 ± 0,392 a	68,421 ± 9,366 a	2,703 ± 0,233 b

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

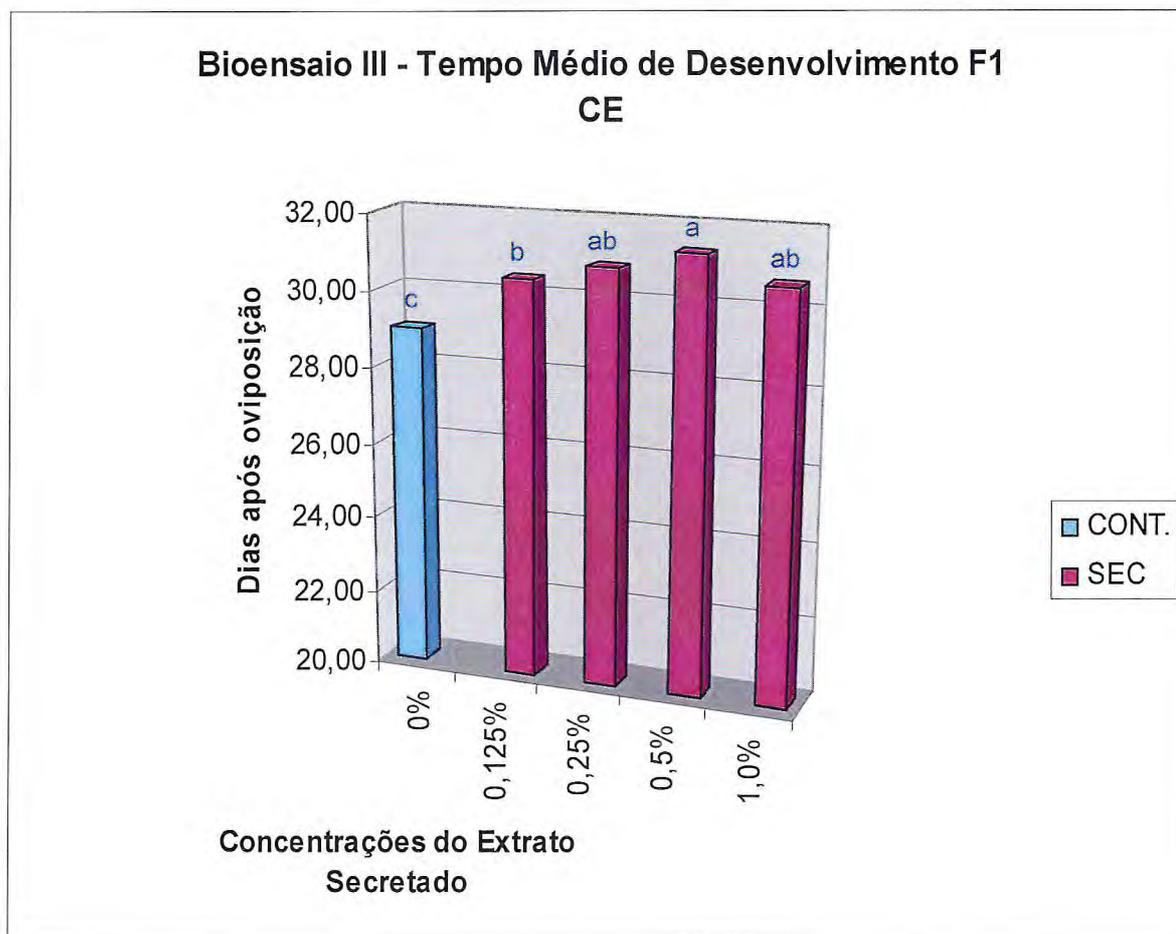


FIGURA 18 – Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Ceará alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células da *Chromobacterium violaceum*.

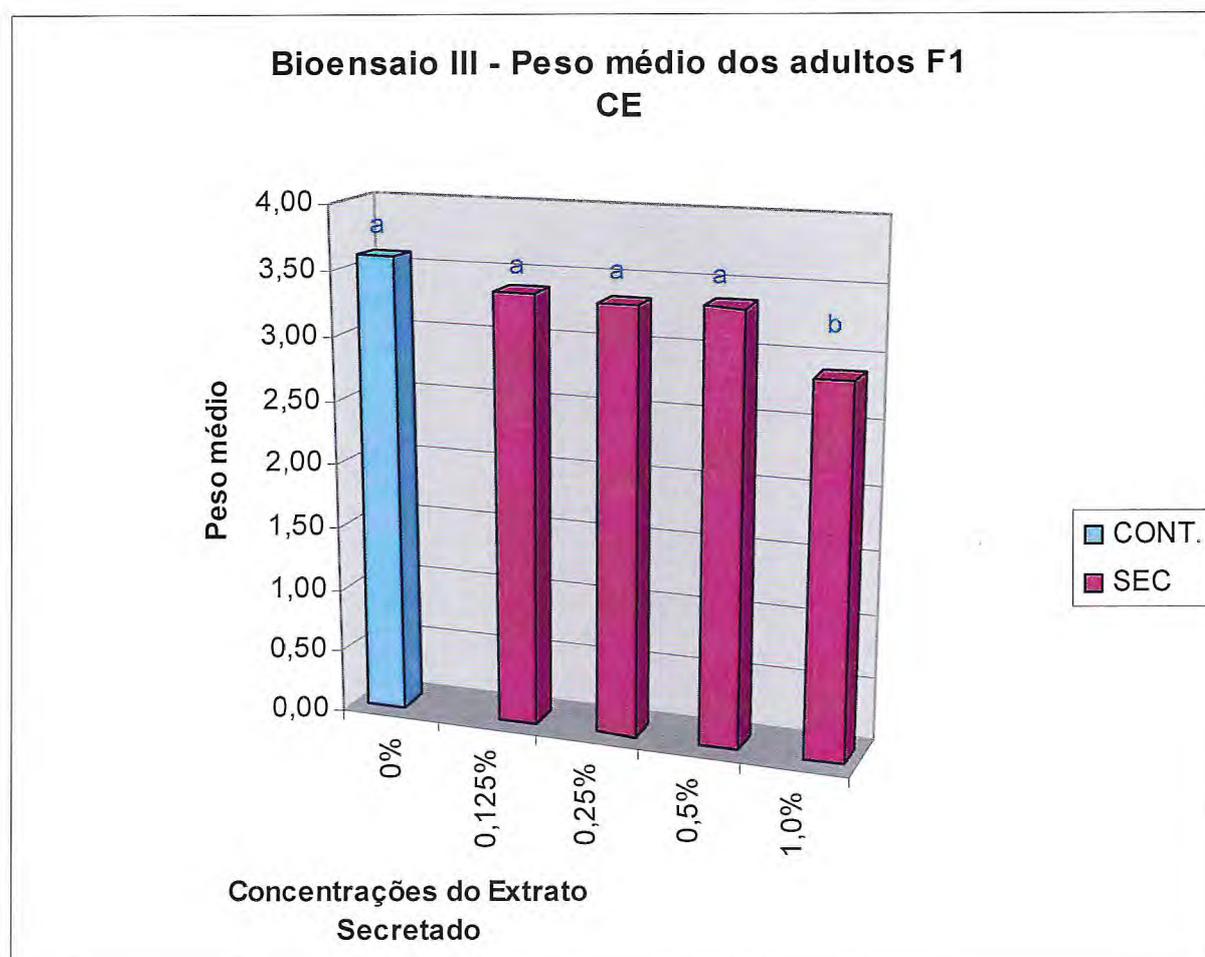


FIGURA 19 – Peso médio dos insetos do Ceará alimentados em sementes artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células da *Chromobacterium violaceum*.

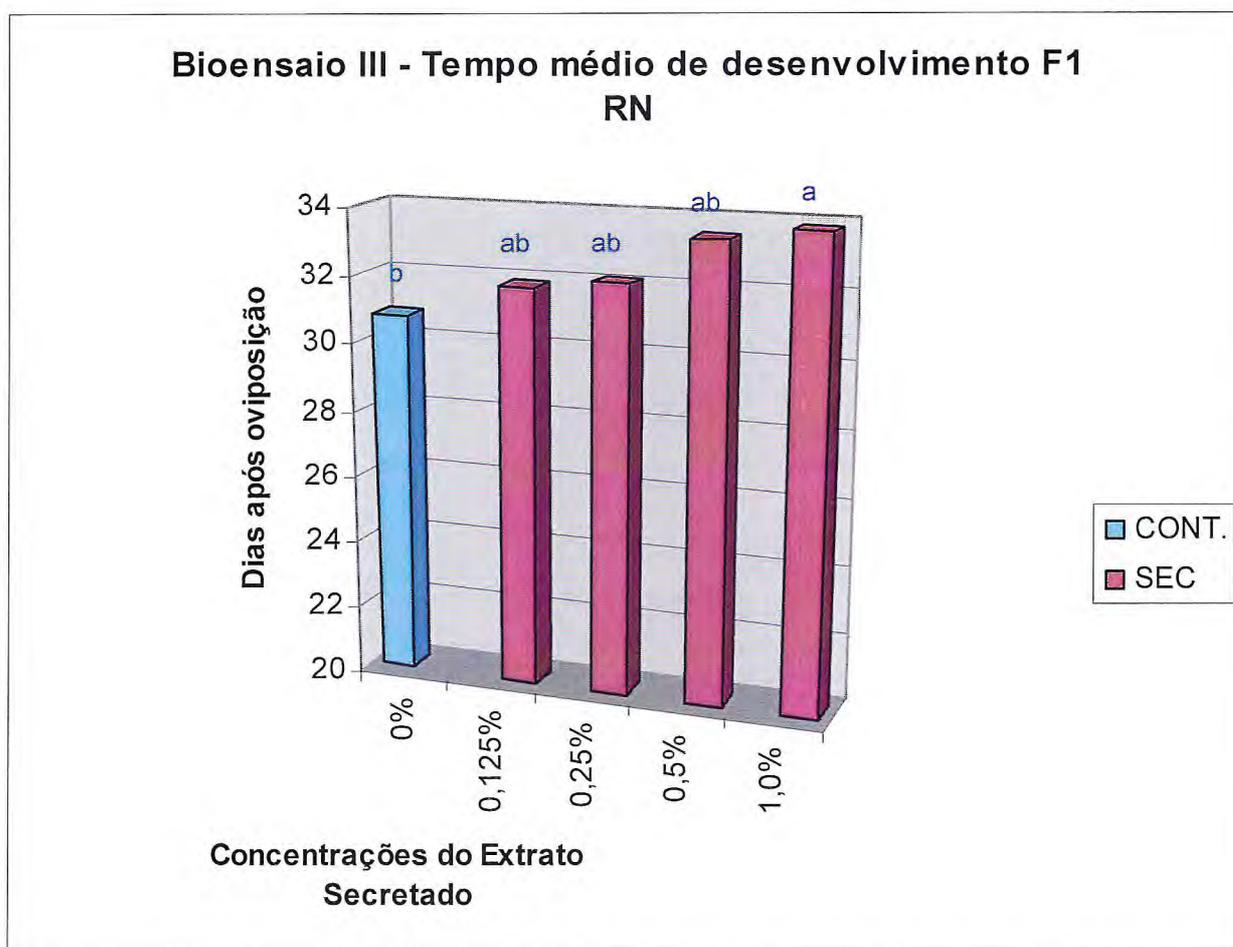


FIGURA 20 – Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte, alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células da *Chromobacterium violaceum*.

O menor valor observado no peso desses insetos foi também o da concentração 1,0%, mas esse valor não diferiu significativamente do observado para o controle. Do mesmo modo, a fração SEC não causou mortalidade nos insetos do Rio Grande do Norte, uma vez que não encontramos diferenças significativas no percentual de emergência entre os tratamentos testados.

O desempenho dos insetos do Ceará também foi superior à dos insetos do Rio Grande do Norte para a fração SEC, desde que um tempo de desenvolvimento significativamente maior foi observado para os insetos do Rio Grande do Norte alimentados em sementes artificiais contendo essa fração em todas as concentrações testadas (Tabela 14; Figura 21). Por outro lado, o peso médio dos insetos do Rio Grande do Norte, foi estatisticamente similar àqueles observados para os insetos do Ceará, embora os valores brutos tenham sido menores, e o efeito da fração SEC sobre o percentual de emergência foi similar para os insetos das duas origens.

TABELA 14 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o material secretado por células de *C. violaceum* no meio de cultura.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
CvCE 0%	28,511 ± 0,647 c	61,972 ± 3,450 a	3,587 ± 0,144 a
CvRN 0%	30,767 ± 0,423 b	71,059 ± 3,248 a	3,163 ± 0,075 abc
CvCE 0,25%	29,440 ± 0,106 bc	80,881 ± 8,785 a	3,372 ± 0,130 ab
CvCE 0,5%	30,231 ± 0,340 bc	73,461 ± 5,359 a	3,340 ± 0,190 ab
CvCE 1,0%	30,406 ± 0,155 b	70,617 ± 1,755 a	3,360 ± 0,044 ab
CvCE 2,0%	29,949 ± 0,166 bc	69,697 ± 3,711 a	2,888 ± 0,090 bc
CvRN 0,25%	32,704 ± 0,780 a	78,431 ± 15,990 a	3,070 ± 0,157 abc
CvRN 0,5%	32,641 ± 0,093 a	71,699 ± 7,192 a	3,281 ± 0,241 ab
CvRN 1,0%	32,699 ± 0,999 a	69,405 ± 2,395 a	2,895 ± 0,079 bc
CvRN 2,0%	33,838 ± 0,392 a	68,421 ± 9,366 a	2,703 ± 0,233 c

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ Os tratamentos infestados com insetos do Ceará estão representados como CvCE e os tratamentos infestados com insetos do Rio Grande do Norte estão designados como CvRN.

² O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

³ O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

⁴ O peso médio dos adultos está expresso em miligramas.

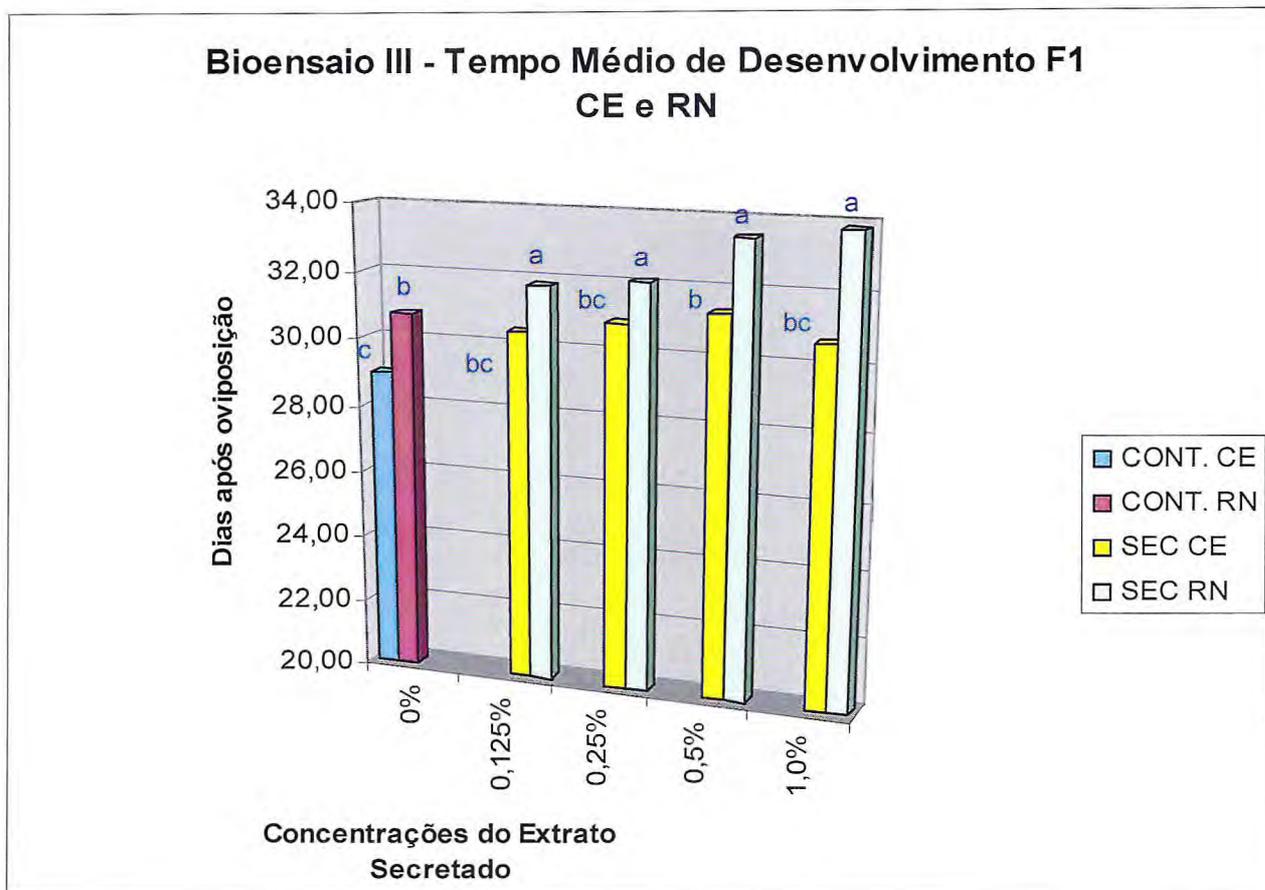


FIGURA 21 – Comparação entre o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte. Insetos alimentados em dietas artificiais contendo o Extrato Secretado no meio de cultura de células de *Chromobacterium violaceum*.

A fração que exibiu o maior efeito inseticida para *C. maculatus* foi o Extrato Total Insolúvel. Essa fração foi capaz de retardar o tempo de desenvolvimento dos insetos do Ceará (Tabela 15; Figura 22) e do Rio Grande do Norte (Tabela 16; Figura 24) por mais de 10 dias.

TABELA 15 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido a partir da lise de células de *Chromobacterium violaceum*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	28,511 ± 0,647 d	61,972 ± 3,450 bc	3,587 ± 0,144 a
ETI 0,125%	32,971 ± 0,581 c	70,345 ± 1,540 ab	3,329 ± 0,025 ab
ETI 0,25%	35,164 ± 0,271 c	71,506 ± 2,604 ab	3,171 ± 0,143 b
ETI 0,5%	36,949 ± 0,524 b	78,307 ± 1,496 a	3,202 ± 0,031 b
ETI 1,0%	40,116 ± 0,816 a	51,920 ± 6,542 c	2,974 ± 0,137 b

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

Para os insetos do Ceará, todos os tratamentos aumentaram o tempo de desenvolvimento em relação ao controle, que foi maior à medida que as concentrações do ETI nas sementes aumentaram.

Essa fração reduziu significativamente o peso dos insetos do Ceará, em relação ao controle, nas concentrações 0,25%, 0,5% e 1,0% (Tabela 15; Figura 23), e o menor percentual de emergência foi observado para a concentração de 1,0%, no entanto esse valor não diferiu do observado para o controle.

Para os insetos do Rio Grande do Norte as concentrações de ETI mais efetivas em retardar o desenvolvimento de *C. maculatus* foram 0,25%, 0,5% e 1,0% (Figura 24).

TABELA 16 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Rio Grande do Norte criados em sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido a partir da lise de células de *Chromobacterium violaceum*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
0%	30,767 ± 0,423 c	71,059 ± 3,248 a	3,163 ± 0,075 a
ETI 0,125%	34,324 ± 0,208 bc	68,050 ± 9,942 a	3,216 ± 0,176 a
ETI 0,25%	35,642 ± 0,335 b	75,555 ± 10,102 a	2,993 ± 0,132 ab
ETI 0,5%	36,708 ± 3,062 ab	68,148 ± 9,993 a	2,977 ± 0,056 ab
ETI 1,0%	41,254 ± 0,351 a	47,917 ± 15,119 a	2,589 ± 0,199 b

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

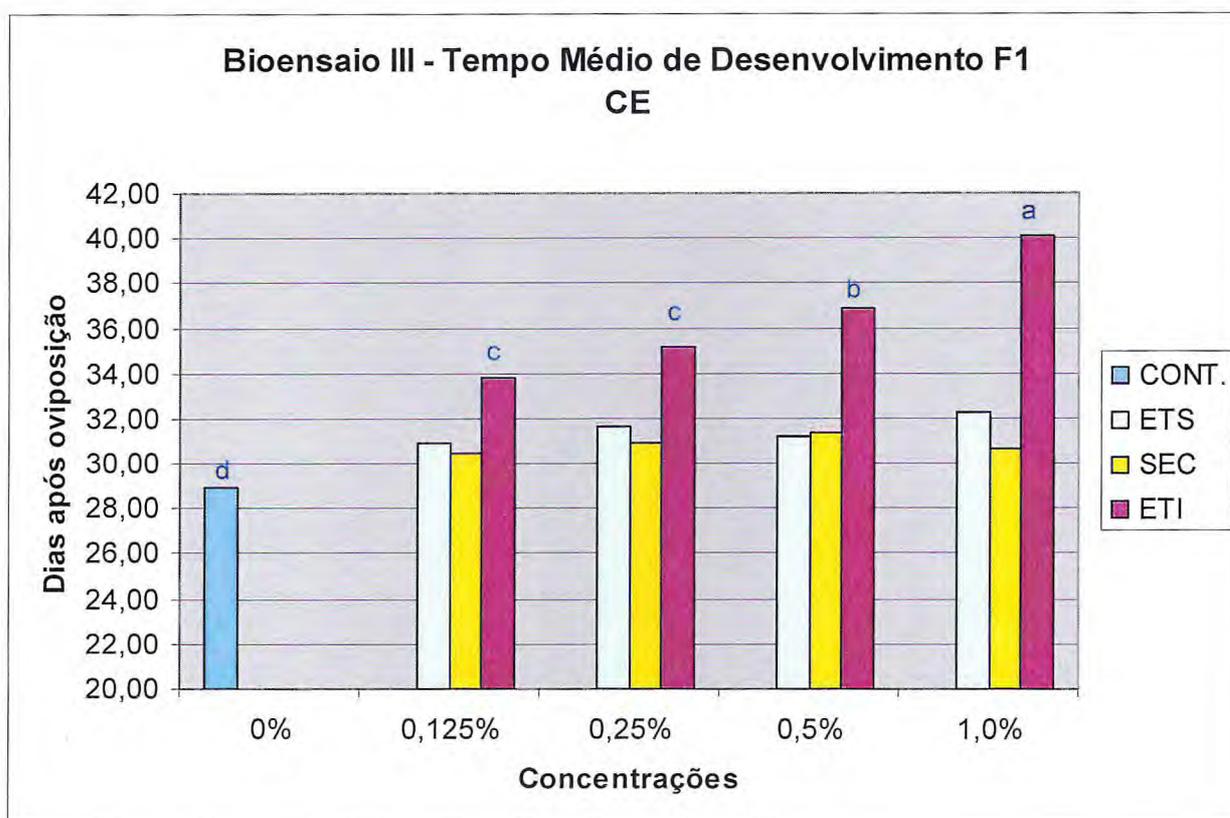


FIGURA 22 – Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Ceará, alimentados com dietas artificiais, com frações obtidas após a lise de células de *C. violaceum*. A fração ETI destaca-se como a mais eficiente em retardar o tempo de desenvolvimento dos insetos.

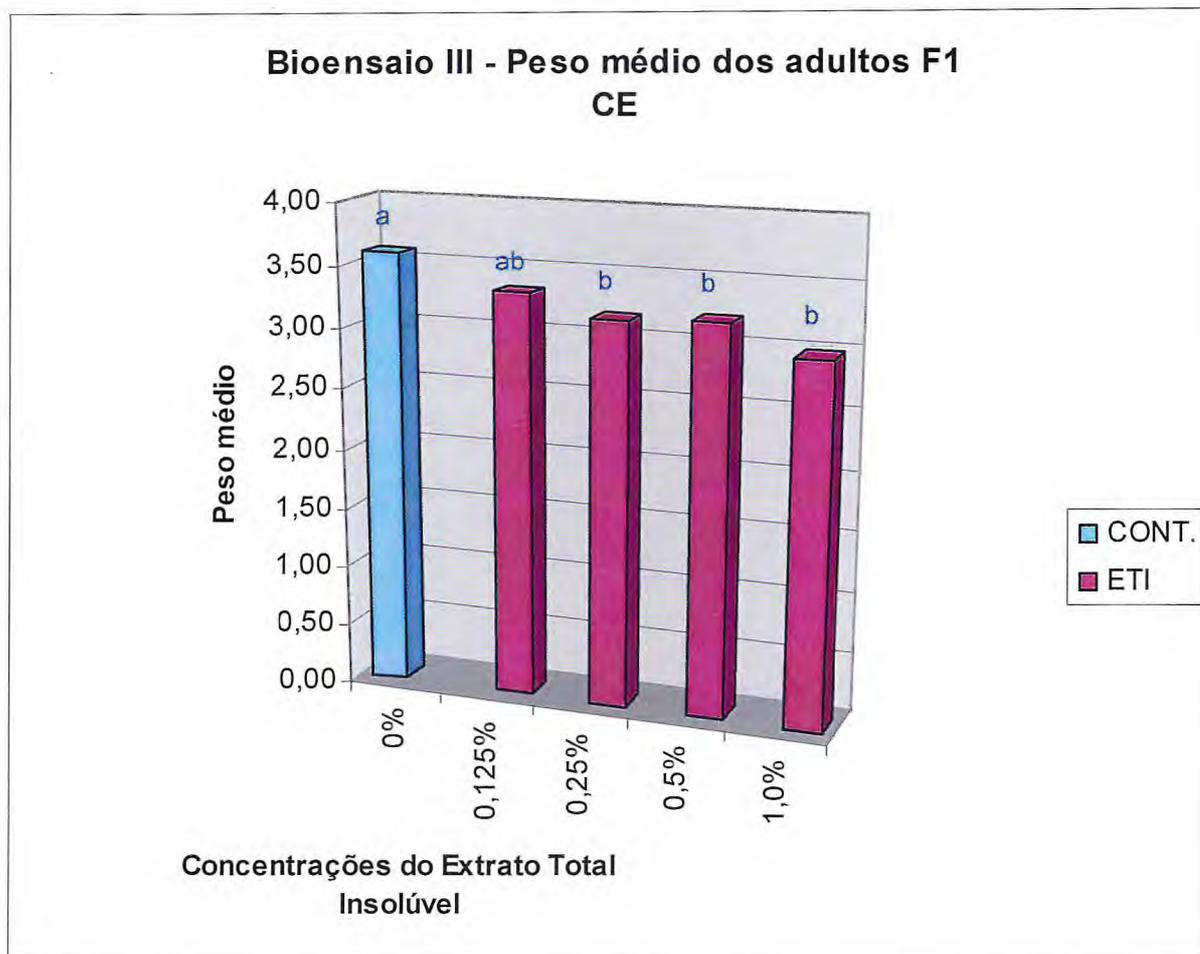


FIGURA 23 – Peso médio dos insetos do Ceará alimentados em sementes artificiais com frações de *Chromobacterium violaceum*.

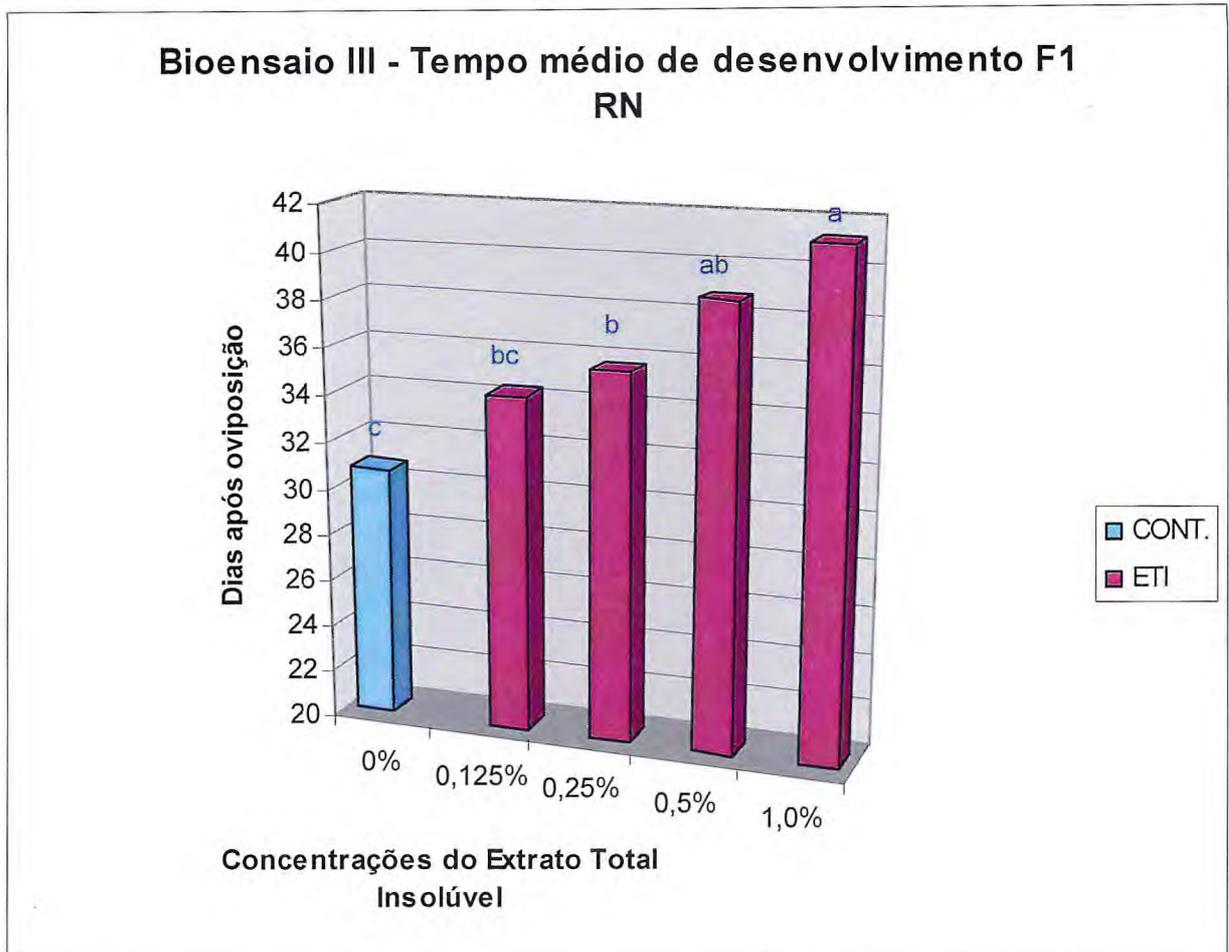


FIGURA 24 – Tempo médio de desenvolvimento dos insetos do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido após a lise de células da *Chromobacterium violaceum*.

O Extrato Total Insolúvel não causou mortalidade nos insetos do Rio Grande do Norte, quando comparado com o controle. No entanto, ETI reduziu significativamente o peso desses insetos na concentração 1,0% (Figura 25).

Para a fração ETI o desempenho dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte foi similar para todas as variáveis testadas (Tabela 17). Os insetos do Rio Grande do Norte apresentaram o maior tempo de desenvolvimento e o menor peso médio para a concentração 1,0%. No entanto, esses valores foram estatisticamente iguais aos dos insetos do Ceará.

TABELA 17 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte alimentados com sementes artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido a partir da lise de células de *C. violaceum*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
CvCE 0%	28,511 ± 0,647 f	61,972 ± 3,450 ab	3,587 ± 0,144 a
CvRN 0%	30,767 ± 0,423 ef	71,059 ± 3,248 ab	3,163 ± 0,075 ab
CvCE 0,25%	32,971 ± 0,581 de	70,345 ± 1,540 ab	3,329 ± 0,025 ab
CvCE 0,5%	35,164 ± 0,271 cd	71,506 ± 2,604 ab	3,171 ± 0,143 ab
CvCE 1,0%	36,949 ± 0,524 bc	78,307 ± 1,496 a	3,202 ± 0,031 ab
CvCE 2,0%	40,116 ± 0,816 ab	51,920 ± 6,542 ab	2,974 ± 0,137 bc
CvRN 0,25%	34,324 ± 0,208 cde	68,050 ± 9,942 ab	3,216 ± 0,176 ab
CvRN 0,5%	35,642 ± 0,335 cd	75,555 ± 10,102 a	2,993 ± 0,132 bc
CvRN 1,0%	36,708 ± 3,062 bcd	68,148 ± 9,993 ab	2,977 ± 0,056 bc
CvRN 2,0%	41,254 ± 0,351 a	47,917 ± 15,119 b	2,589 ± 0,199 c

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ Os tratamentos infestados com insetos do Ceará estão representados como CvCE e os tratamentos infestados com insetos do Rio Grande do Norte estão designados como CvRN.

² O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

³ O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

⁴ O peso médio dos adultos está expresso em miligramas.

O desempenho dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte, emergidos de cápsulas artificiais, foi testada em sementes de *V. unguiculata*. A única variável que apresentou diferença significativa, para os insetos do Ceará, foi o percentual de eclosão de larvas, onde os insetos emergidos do controle apresentaram um percentual menor que os emergidos dos tratamentos com frações de *C. violaceum* (Tabela 18).

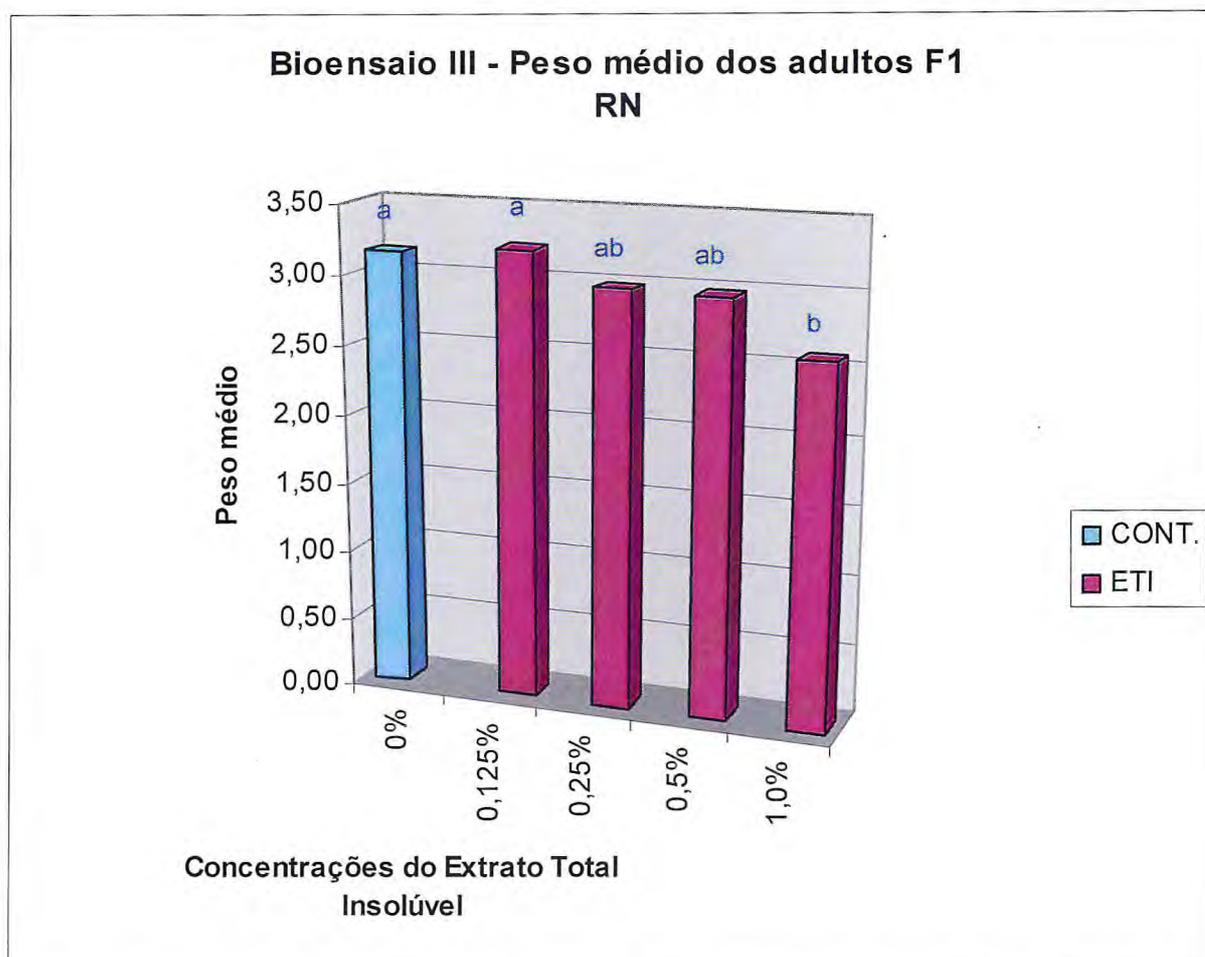


FIGURA 25 – Peso médio dos insetos do Rio Grande do Norte, alimentados em dietas artificiais contendo o Extrato Total Insolúvel obtido após a lise das células de *Chromobacterium violaceum*.

TABELA 18 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência, Número de Ovos por Fêmea e Percentual de Eclosão de Larvas dos insetos do Ceará em sementes de *Vigna unguiculata*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	NO/F ³	%EL ⁴
0%	28.27 ± 0.17 a	96.38 ± 2.46 a	71.83 ± 4.40 a	95.81 ± 0.25 b
ETS 1.00%	28.60 ± 0.48 a	97.63 ± 1.96 a	69.67 ± 3.68 a	99.55 ± 0.64 a
SEC 1.00%	27.82 ± 0.16 a	93.28 ± 0.93 a	59.33 ± 7.96 a	98.81 ± 0.59 a
ETI 1.00%	28.64 ± 0.39 a	95.79 ± 3.56 a	67.83 ± 3.06 a	99.05 ± 0.67 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ Número de ovos por fêmea.

⁴ Percentual de eclosão de larvas.

Para os insetos do Rio Grande do Norte testados em sementes de *V. unguiculata*, a única diferença observada foi em relação ao tempo médio de desenvolvimento dos adultos gerados por insetos alimentados com as frações ETS e ETI, nas concentrações de 1,0%. No entanto, esses valores não diferiram do controle (Tabela 19).

TABELA 19 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência, Número de Ovos por Fêmea e Percentual de Eclosão de Larvas dos insetos do Rio Grande do Norte em sementes de *Vigna unguiculata*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	NO/F ³	%EL ⁴
Controle	28.63 ± 0.43 ab	93.98 ± 2.05 a	70.67 ± 7.98 a	96.42 ± 2.86 a
ETS 1.00%	27.36 ± 0.80 b	98.27 ± 1.22 a	58.83 ± 0.62 a	97.73 ± 0.41 a
SEC 1.00%	29.19 ± 0.20 ab	98.23 ± 1.40 a	62.67 ± 8.18 a	98.20 ± 1.98 a
ETI 1.00%	29.73 ± 0.86 a	90.63 ± 4.06 a	56.50 ± 1.47 a	94.30 ± 4.22 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ Número de ovos por fêmea.

⁴ Percentual de eclosão de larvas.

De um modo geral, o desempenho dos insetos criados em cápsulas com frações de *C. violaceum*, do Ceará e do Rio Grande do Norte, avaliado em sementes de *V. unguiculata*, foi similar para todas as variáveis, entre insetos oriundos dos controles e do mesmo tipo de fração (Tabela 20).

TABELA 20 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência, Número de Ovos por Fêmea e Percentual de Ecloração de Larvas dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte em sementes de *Vigna unguiculata*.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	NO/F ³	%EL ⁴
Controle CE	28.27 ± 0.17 abc	96.38 ± 2.46 a	71.83 ± 4.40 a	95.81 ± 0.25 cd
Controle RN	28.63 ± 0.43 abc	93.98 ± 2.05 a	70.67 ± 7.98 a	96.42 ± 2.86 bcd
ETSCE 1.00%	28.60 ± 0.48 abc	97.63 ± 1.96 a	69.67 ± 3.68 a	99.55 ± 0.64 a
SECCE 1.00%	27.82 ± 0.16 bc	93.28 ± 0.93 a	59.33 ± 7.96 a	98.81 ± 0.59 ab
ETICE 1.00%	28.64 ± 0.39 abc	95.79 ± 3.56 a	67.83 ± 3.06 a	99.05 ± 0.67 ab
ETSRN 1.00%	27.36 ± 0.80 c	98.27 ± 1.22 a	58.83 ± 0.62 a	97.73 ± 0.41 abc
SECRN 1.00%	29.19 ± 0.20 ab	98.23 ± 1.40 a	62.67 ± 8.18 a	98.20 ± 1.98 abc
ETIRN 1.00%	29.73 ± 0.86 a	90.63 ± 4.06 a	56.50 ± 1.47 a	94.30 ± 4.22 d

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ Número de ovos por fêmea.

⁴ Percentual de ecloração de larvas.

A única diferença significativa observada nesse sentido diz respeito à variável percentual de larvas eclodidas, para os insetos criados na fração ETI 1,0%. O percentual de ecloração de larvas dos insetos do Rio Grande do Norte foi significativamente menor que o valor encontrado para os insetos do Ceará (Tabela 20; Figura 26).

A eletroforese em gel com concentração final de poliacrilamida de 12,5% das frações testadas no bioensaio III (Figura 27) exibiu uma gama de proteínas na fração ETS. As principais bandas observadas nas amostras dessa fração possuem correspondentes nas frações ETI e ES, excetuando uma banda com massa aparente um pouco superior a 60 kDa, que não é visível na fração ETI, mas possui um correspondente na fração ES. Na fração ETI podemos observar uma grande quantidade de proteínas em torno de 40 kDa, que parece corresponder a duas bandas observadas nas frações ETS e ES. Quatro bandas com massa aparente entre 65 e 85 kDa aparecem exclusivamente na fração ETI, assim como uma banda com massa aparente um pouco inferior a 50 kDa. A maioria dessas bandas pode ser visualizada nas amostras correspondentes ao extrato total de *C. violaceum*.

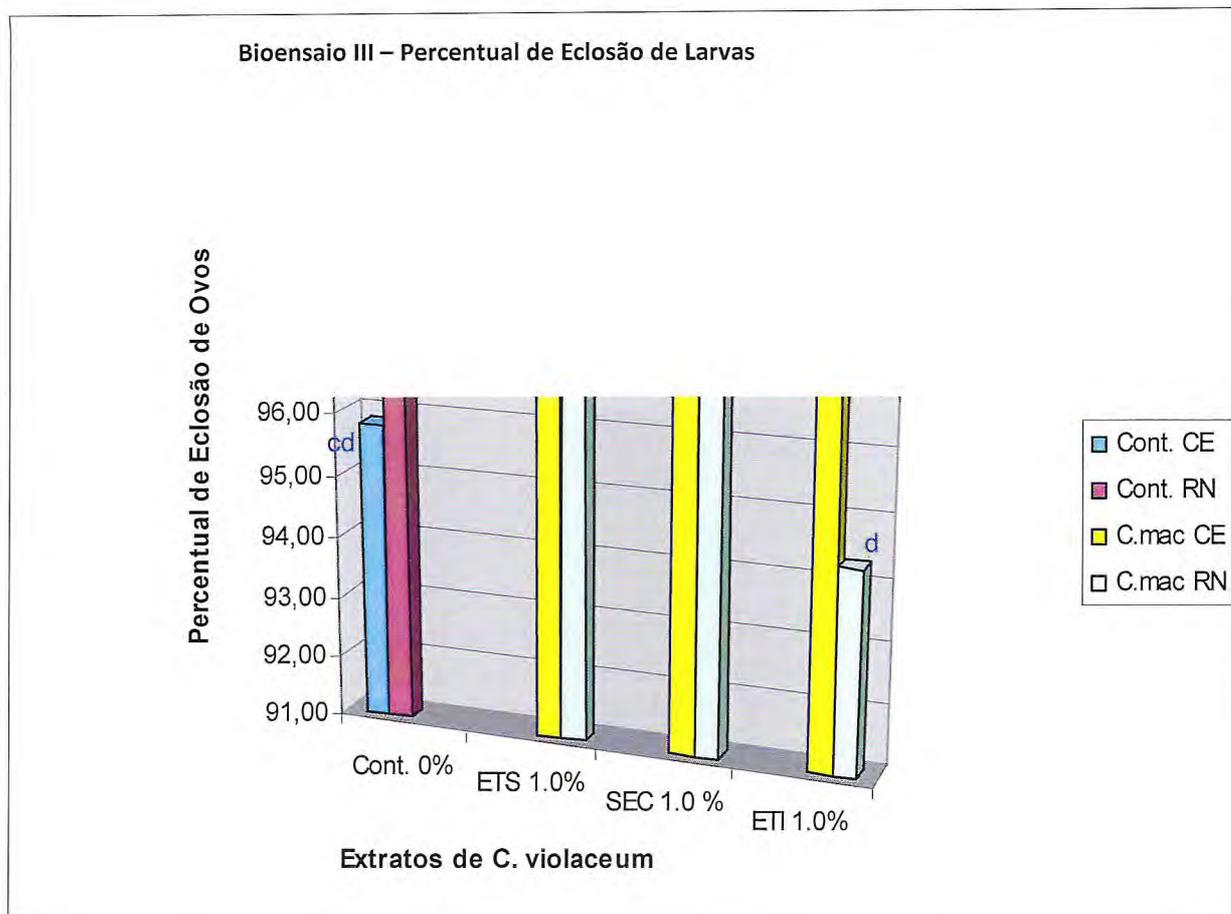


FIGURA 26 – Percentual de eclosão de larvas dos insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte. A oviposição foi efetuada em sementes de *Vigna unguiculata* por insetos alimentados com dietas artificiais contendo frações obtidas após a lise de células de *C. violaceum*, na concentração de 1%.

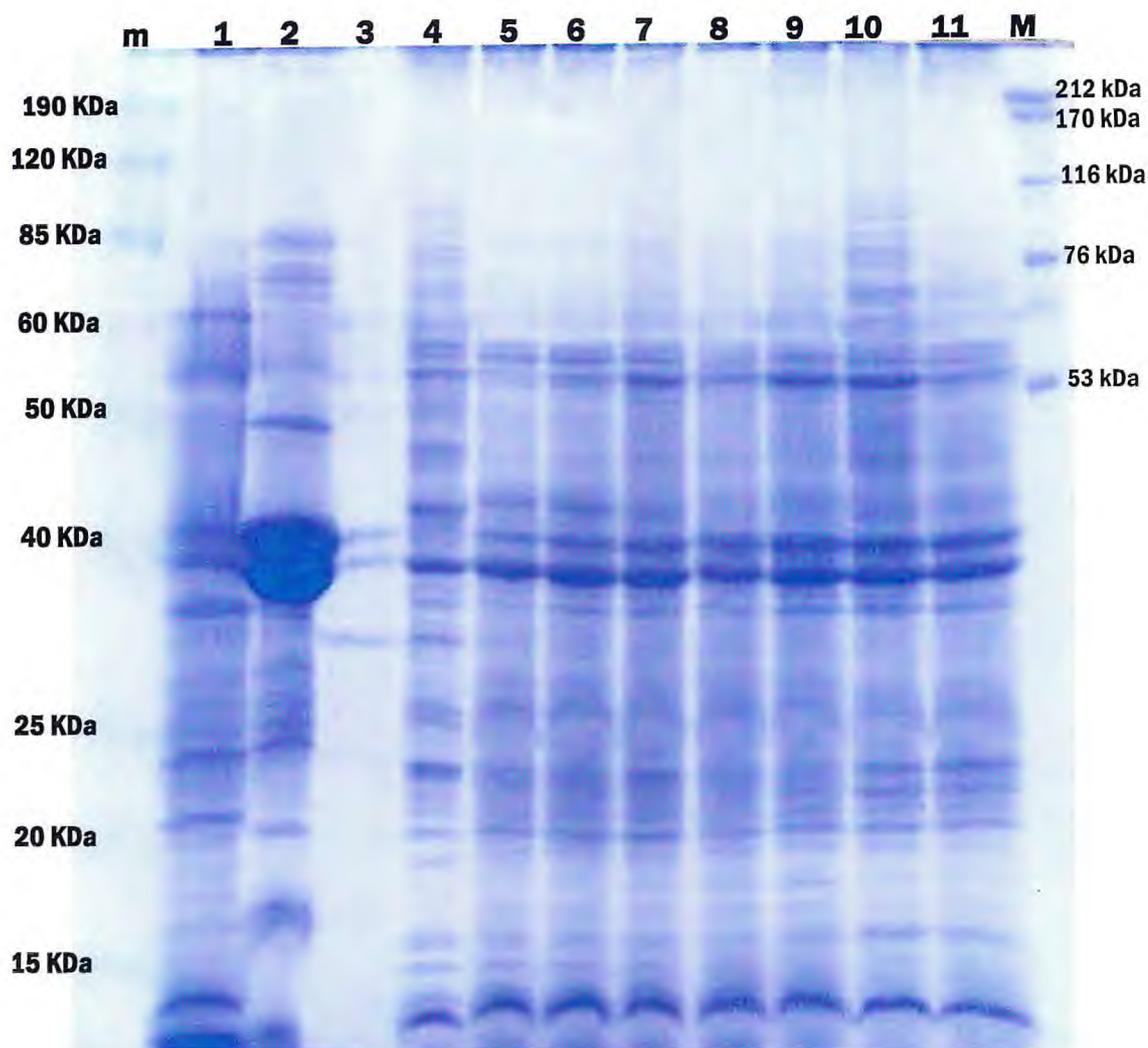


FIGURA 27 – Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos obtidos por meio da lise de células de *C. violaceum*. As setas vermelhas indicam as 7 bandas mencionadas no texto. Amostras: **m**. Marcador de baixo peso molecular; **1**. Extrato total solúvel (ETS); **2**. Extrato total Insolúvel (ETI); **3**. Extrato Secretado (ES); **4 a 11**. Extrato total das células de *C. violaceum* coletadas, respectivamente, após 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas de cultivo. **M**. Marcador de alto peso molecular.

Algumas proteínas são secretadas no meio de cultura por células de *C. violaceum*, e 7 bandas principais podem ser observadas com o corante utilizado (Figura 27). Duas dessas bandas aparecem exclusivamente na amostra correspondente ao “extrato secretado”. A primeira possui uma massa aparente de 50 kDa e a segunda, que aparece como a principal proteína secretada no meio de cultura por células de *C. violaceum* (Figura 28), possui uma massa aparente em torno de 30 kDa.

6.3 Clonagem do gene CV1887

6.3.1 Extração do DNA genômico de *Chromobacterium violaceum*

O método de extração de DNA genômico baseado no uso de CTAB mostrou-se eficiente para células da *C. violaceum*, como pode ser constatado pela análise eletroforética da preparação (Figura 29) e pela concentração estimada por meio da medida da absorvância a 260 nm. A concentração obtida pela absorvância a 260 nm foi de 255 ng/ μ L e a relação entre a A_{260} e a A_{280} foi de 1,95.

6.3.2 Amplificação do gene CV1887

Os produtos de PCR obtidos a partir da reação de amplificação realizada com o par de iniciadores CV1887-*for* e CV1887-*rev* seguiram o padrão esperado (Figura 30). Uma banda de aproximadamente 4.158 pb foi revelada na eletroforese do PCR, quando utilizado como substrato o DNA genômico de *C. violaceum*.

6.3.3 Ligação dos insertos no vetor de clonagem pGEM-T *Easy*

A eletroforese em gel de agarose dos plasmídios extraídos das colônias brancas e azuis obtidas após a eletroporação de células DH10B com o vetor de clonagem pGEM-T *Easy*, após a reação de ligação com os produtos de PCR construídos com os iniciadores CV1887-*for* e CV1887-*rev*, revelou diferenças entre os tamanhos dos fragmentos extraídos das colônias brancas e azuis, o que indica a eficiência da clonagem (Figura 31).

A eletroforese em gel de agarose 0,8% realizada a partir dos produtos de PCR amplificados a partir dos plasmídios extraídos dos clones de *E. coli* DH10B transformados com o gene CV1887 exibiu bandas do tamanho esperado (4158 pb), confirmando a eficiência da ligação do inserto no vetor de clonagem (Figura 32).

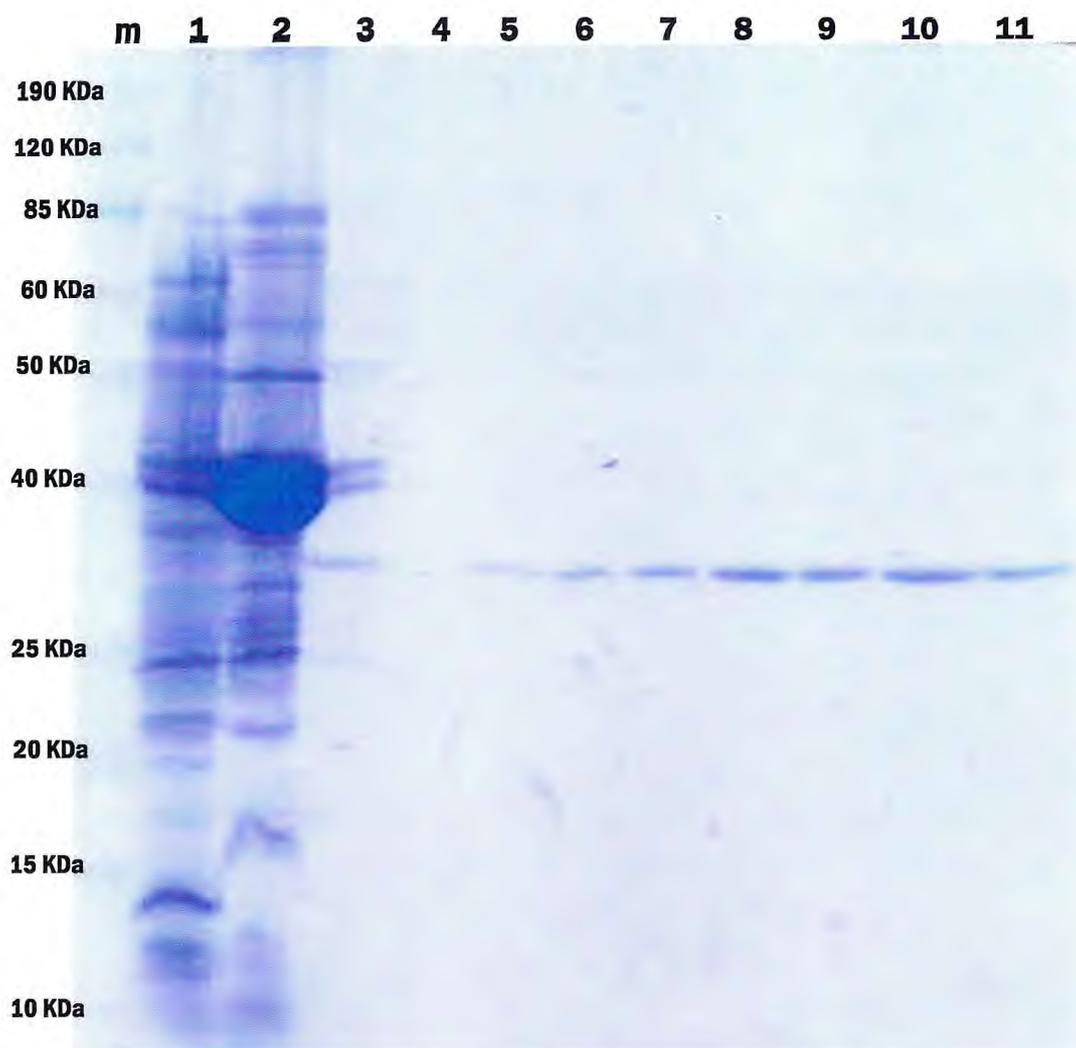


FIGURA 28 – Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos obtidos após a lise de células de *C. violaceum* e do meio de cultura separado das células por centrifugação. Amostras: **m**. Marcador de baixo peso molecular; **1**. Extrato total solúvel (ETS); **2**. Extrato total Insolúvel (ETI); **3**. Extrato Secretado (ES); **4 a 11**. Meio de cultura separado por centrifugação das células de *C. violaceum* coletadas, respectivamente, após 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas de cultivo.

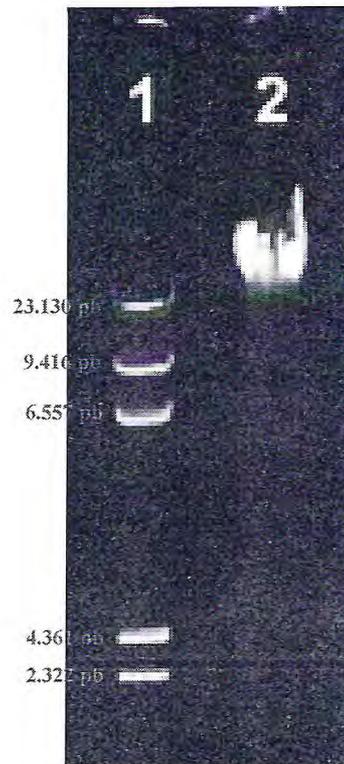


FIGURA 29 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA genômico de *Chromobacterium violaceum*. Poço 1: Marcador de massa molecular λ DNA/*Hind*III digest (Invitrogen), 250 ng. Tamanhos dos fragmentos, em pb, do marcador λ DNA/*Hind*III (23.130 pb; 9.416 pb; 6.557 pb; 4.361 pb; 2.322 pb); Poço 2: DNA genômico de *C. violaceum*, aproximadamente 1.275 ng.

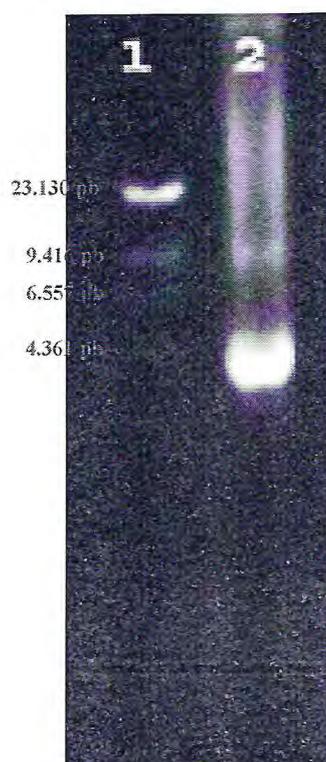


FIGURA 30 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR, obtidos a partir do DNA genômico de *C. violaceum*. Poço 1: Marcador de massa molecular λ DNA/*Hind*III digest (Invitrogen), 250 ng (23.130 pb; 9.416 pb; 6.557 pb; 4.361 pb; 2.322 pb); Poço 2: Produto de PCR obtido com o par de primers CV1887-for/CV1887-rev.



FIGURA 31 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pGEM-T *Easy* isolados de células *Escherichia coli* DH10B. Poços 1 e 2: Colônias azuis. Poços 3 a 10: Colônias brancas. M: marcador de massa molecular λ DNA/HindIII *digest* (Invitrogen), 250 ng (23.130 pb; 9.416 pb; 6.557 pb; 4.361 pb; 2.322 pb).

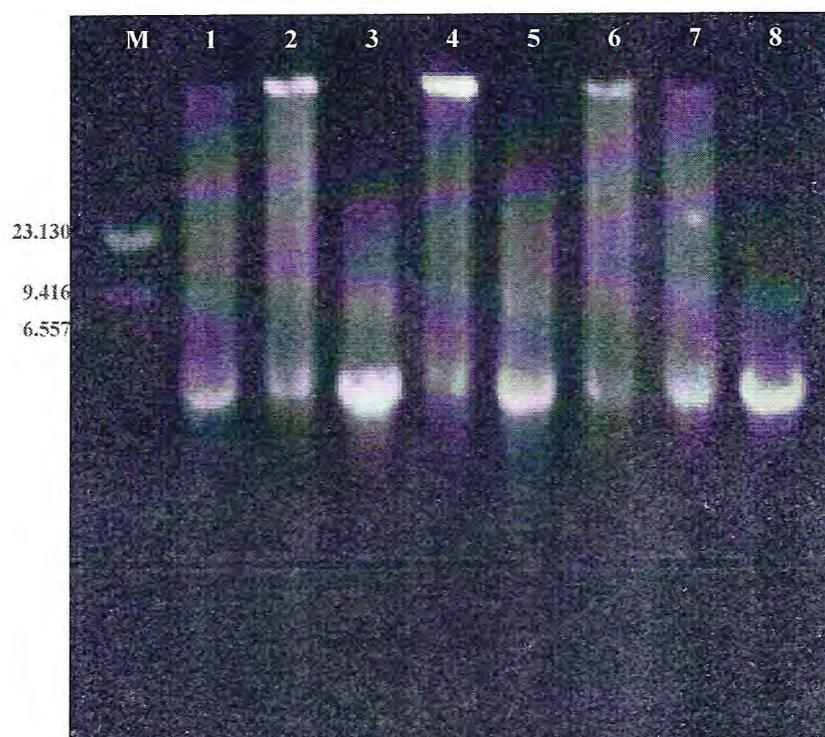


FIGURA 32 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR obtidos a partir dos plasmídeos pGEM-T *Easy*::CV1887 isolados de células recombinantes de *E. coli* DH10B. M: Marcador de massa molecular λ DNA/*Hind*III digest (Invitrogen), 250 ng (23.130 pb; 9.416 pb; 6.557 pb; 4.361 pb; 2.322 pb); Poços 1 A 8: Produtos de PCR obtido com o par de primers CV1887-for/CV1887-rev.

6.3.4 Ligação dos insertos no vetor de expressão pBAD-C *Myc*-His

Células da bactéria *E. coli* TOP10 transformadas com o vetor de expressão pBAD/*Myc*-His C contendo o fragmento correspondente ao gene CV1887 foram selecionadas em meio LB agar, contendo ampicilina 100 µg/mL e estreptomicina 30 µg/mL. Após o período de incubação de aproximadamente 24 horas a 37 °C, várias colônias foram visualizadas nas placas de todos os eventos de transformação. De cada uma dessas transformações, 10 clones foram selecionados ao acaso para extração de DNA plasmidial (Figura 33). No poço 10, podemos observar um fragmento com tamanho diferente dos demais, com aproximadamente 4361 pb, que indicou a transformação deste clone.

Os plasmídeos isolados pelo método de lise alcalina foram utilizados como substrato para uma reação de PCR, utilizando os iniciadores específicos do fragmento correspondente ao clone CV1887. A eletroforese dos fragmentos amplificados revelou que, para o fragmento CV1887, apenas um dos dez clones escolhidos (10%) continha a seqüência correspondente ao fragmento clonado (Figura 34).

6.4 Indução de expressão da proteína recombinante codificada pelo gene CV1887

6.4.1 Indução das células de *E. coli* TOP10 utilizadas como controle

As preparações utilizadas como controle da indução de expressão do gene CV1887 exibiram um padrão similar para todas as amostras analisadas. As células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pBAD/*Myc*-His/*lacZ* expressaram a proteína β-galactosidase 4 horas após a indução com 0,2% de L-arabinose (Figura 35).

6.4.2 Determinação da concentração ideal de L-arabinose para a indução

A eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras de células de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 exibiu um padrão similar para todas as concentrações de L-arabinose testadas (Figura 36). O padrão observado se assemelha muito ao dos controles. Observamos uma banda com tamanho aproximado ao predito (~ 153 kDa) para a proteína codificada pelo gene CV1887. No entanto, bandas com massas aparentes muito aproximadas também podem ser vistas nos controles.

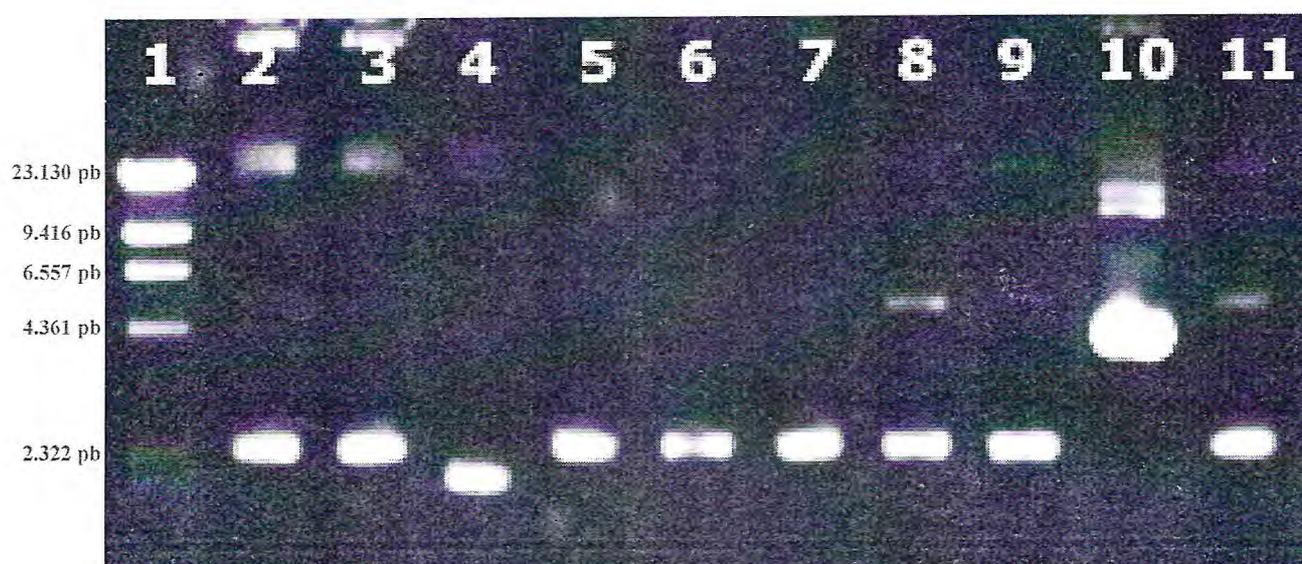


FIGURA 33 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos dos plasmídeos pBAD-C::CV1887 isolados de células recombinantes de *E. coli*. Poço 1: Marcador de massa molecular λ DNA/*Hind*III digest (Invitrogen), 250 ng (23.130 pb; 9.416 pb; 6.557 pb; 4.361 pb; 2.322 pb); Poços 2 a 11: Clones dos plasmídeos isolados pelo método de lise alcalina.

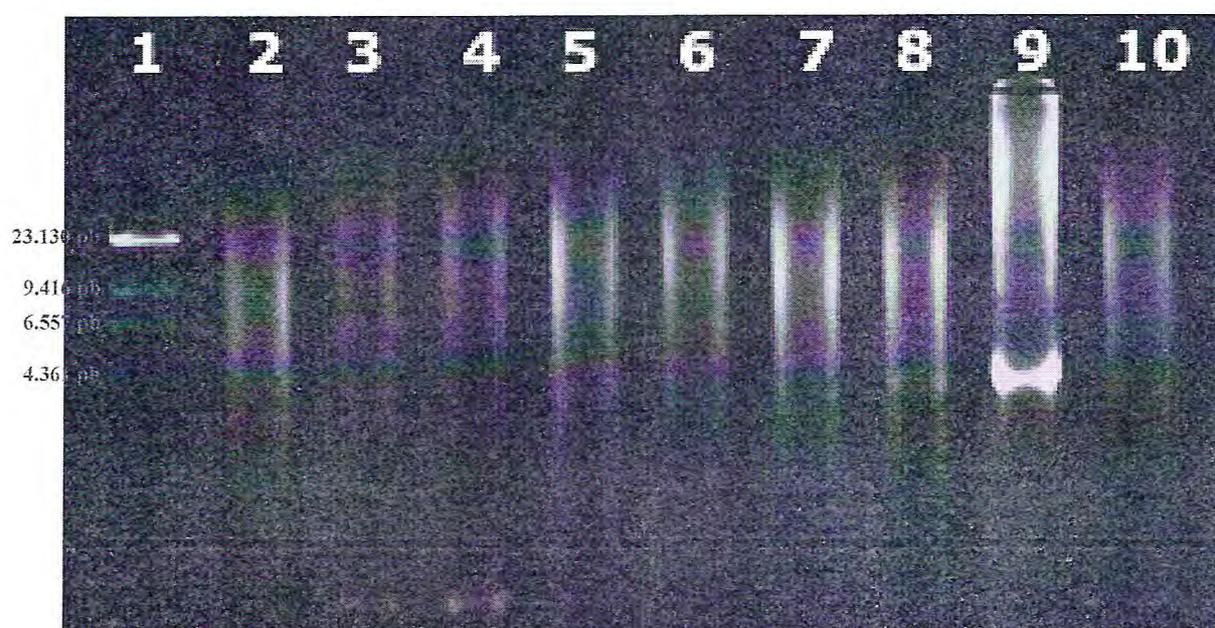


FIGURA 34 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR dos plasmídeos pBAD-C::CV1887 isolados de células recombinantes de *Escherichia coli*. Poço 1: Marcador de massa molecular λ DNA/*Hind*III digest (Invitrogen), 250 ng (23.130 pb; 9.416 pb; 6.557 pb; 4.361 pb; 2.322 pb); Poços 2: Controle negativo da reação (com água); Poços 3 a 10: Produtos de PCR obtidos com o par de primers CV1887-for/CV1887-rev. O poço 9 corresponde ao clone transformado, verificado no poço 10 da Figura 33.

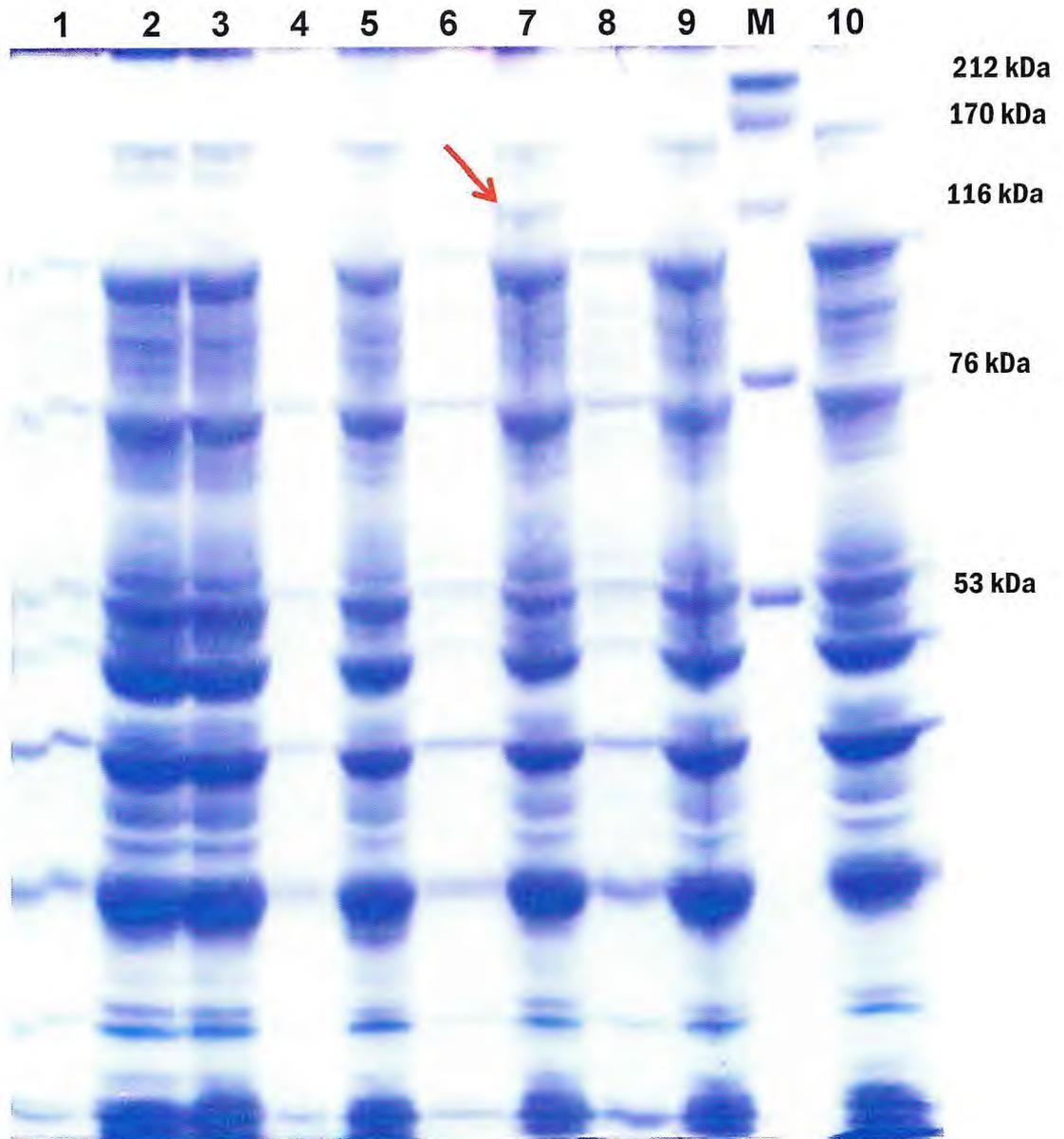


FIGURA 35 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras utilizadas como controle para as induções. A seta vermelha indica a banda correspondente à β -galactosidase. Amostras: **1.** *E. coli* TOP10 induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; **2.** *E. coli* TOP10 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **3.** *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His C, não induzido, 4 h; **4.** *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His C induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; **5.** *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His C induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **6.** *E. coli* TOP10-pBAD/*Myc*-His/*lacZ* induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; **7.** *E. coli* TOP10 + pBAD/*Myc*-His/*lacZ* induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **8.** *E. coli* TOP10 + pBAD/*Myc*-His/*lacZ* não induzido, 0 h; **9.** *E. coli* TOP10 + pBAD/*Myc*-His/*lacZ* não induzido, 4 h; **10.** *E. coli* TOP10, não induzido, 4 h; **M.** Marcador de alto peso molecular.

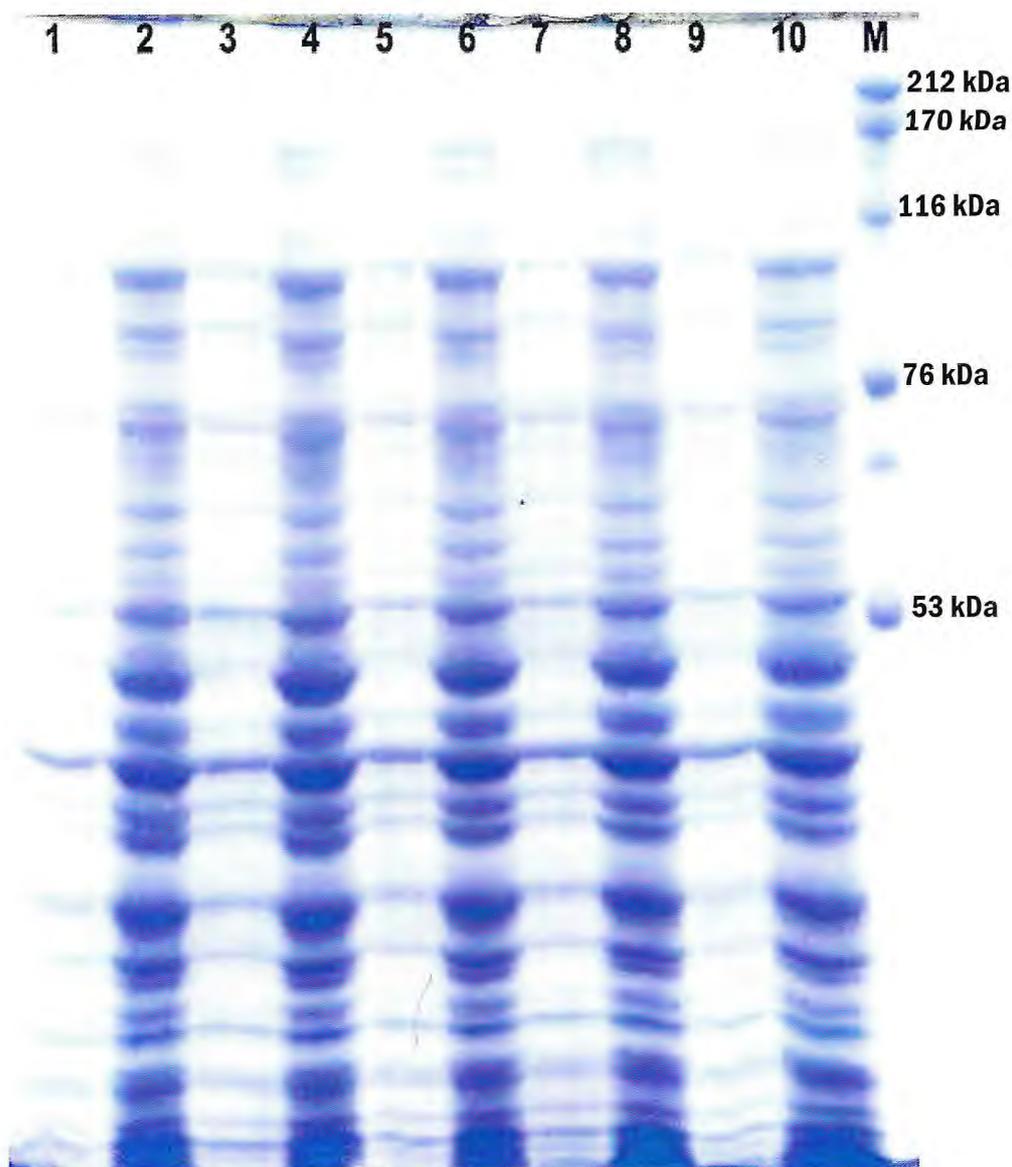


FIGURA 36 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras de *E. coli* TOP10::CV1887, induzidas com diferentes concentrações de L-arabinose. Amostras: **1.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,00002% de L-arabinose, 0 h; **2.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,00002% de L-arabinose, 4 h; **3.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,0002% de L-arabinose, 0 h; **4.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,0002% de L-arabinose, 4 h; **5.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,002% de L-arabinose, 0 h; **6.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,002% de L-arabinose, 4 h; **7.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,02% de L-arabinose, 0 h; **8.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,02% de L-arabinose, 4 h; **9.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; **10.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **M.** Marcador de alto peso molecular.

6.4.3 Lise das células de *E. coli* TOP10 contendo o inserto CV1887

A eletroforese em gel de poliacrilamida da Fração Insolúvel obtida após a lise das células de *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídio pBAD::CV1887 e com as amostras controle revelaram a expressão de uma grande quantidade da proteína β -galactosidase para o controle induzido. Uma banda com uma massa aparente em torno de 115 KDa foi observada para todas as concentrações de L-arabinose testadas nas células de *E. coli* com o inserto CV1887 (Figura 37).

A eletroforese da Fração Solúvel realizada com as mesmas amostras não apresentou a banda relativa à β -galactosidase, e exibiu um padrão similar para todas as amostras, não sendo observada a indução de nenhuma proteína isolada para as células de *E. coli* contendo o plasmídeo pBAD::CV1887 (Figura 38).

6.4.4 Bioensaio IV

A violaceína não exibiu nenhum efeito sobre os insetos de *C. maculatus* quando testadas nas concentrações 0,125%, 0,5% e 1,0%, desde que nenhuma diferença significativa entre as médias foi observada (Tabela 21; Figura 39).

As células de *E. coli* TOP10 contendo o inserto CV1887 clonado no vetor pBAD não exibiram nenhum efeito sobre o peso das larvas de *C. maculatus*, e os tratamentos com diferentes concentrações dessas células não causaram mortalidade em níveis significativos, quando comparados ao controle. No entanto, todas as concentrações testadas retardaram o tempo de desenvolvimento dos insetos (Tabela 22; Figura 39).

TABELA 21 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos alimentados em sementes artificiais contendo violaceína.

Tratamentos	TMD ¹	%EM ²	PM ³
Controle	29,75 ± 0,01 a	83,06 ± 7,41 a	3,047 ± 0.40 a
Viol. 0.125%	30,56 ± 0,82 a	67,00 ± 2,05 a	3,328 ± 0.08 a
Viol. 0.25%	30,31 ± 0,55 a	71,70 ± 7,82 a	3,556 ± 0.09 a
Viol. 0.5%	30,77 ± 0,50 a	77,80 ± 7,88 a	3,580 ± 0.09 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

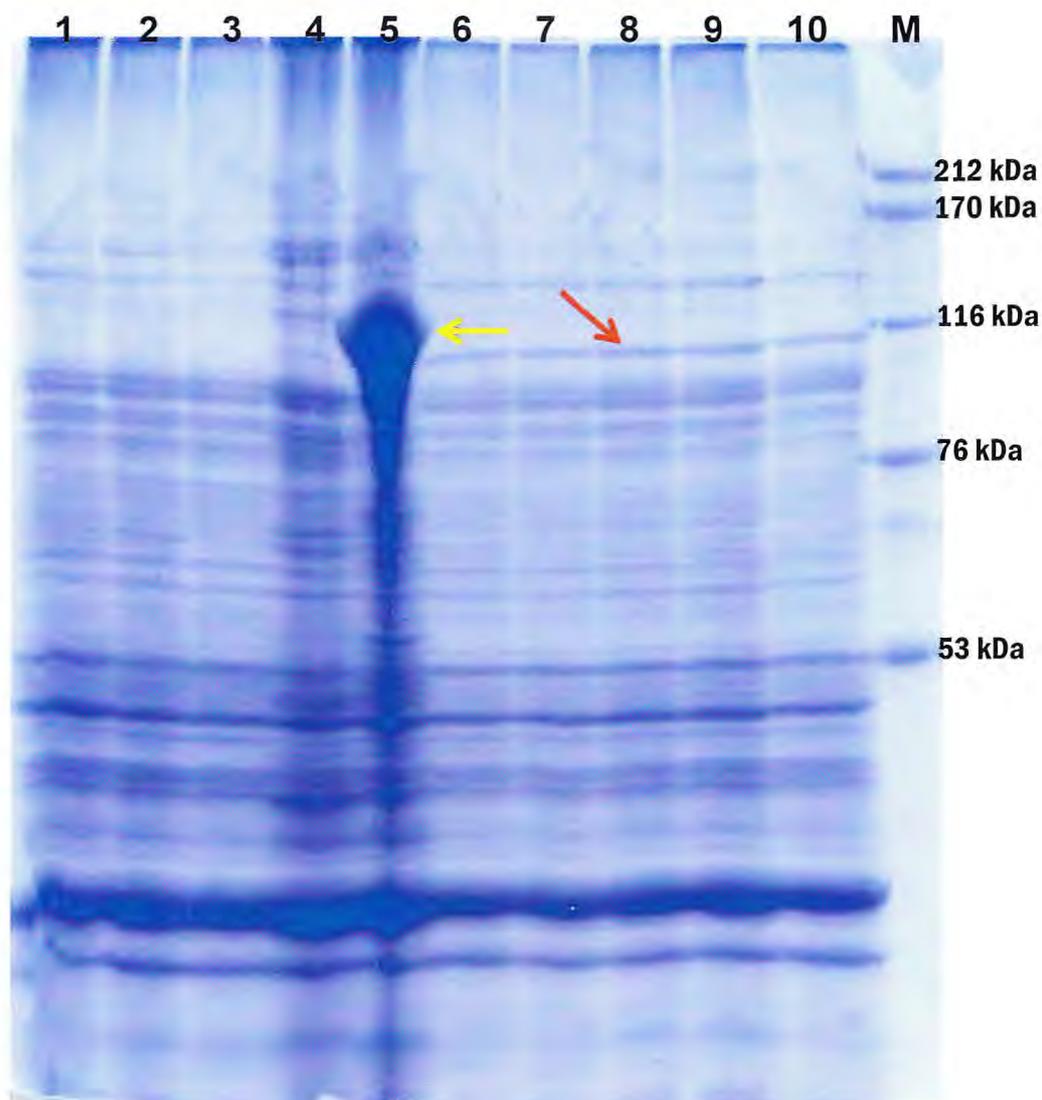


FIGURA 37 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da Fração Insolúvel obtida após a lise das células de *E. coli* TOP10 utilizadas como controle ou contendo o gene CV1887, induzidas com diferentes concentrações de L-arabinose. A seta vermelha indica uma proteína induzida em todas as amostras contendo os plasmídeos pBAD::CV1887. A seta amarela mostra a β -galactosidase. Amostras: **1.** *E. coli* TOP10 induzido com 0,2% de L-arabinose, 0 h; **2.** *E. coli* TOP10-pBAD-C não-induzido, 4 h; **3.** *E. coli* TOP10-pBAD-C induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **4.** *E. coli* TOP10-pBAD/lacZ não-induzido, 4 h; **5.** *E. coli* TOP10-pBAD/lacZ induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **6.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,00002% de L-arabinose, 4 h; **7.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,0002% de L-arabinose, 4 h; **8.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,002% de L-arabinose, 4 h; **9.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,02% de L-arabinose, 4 h; **10.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **M.** Marcador de alto peso molecular.

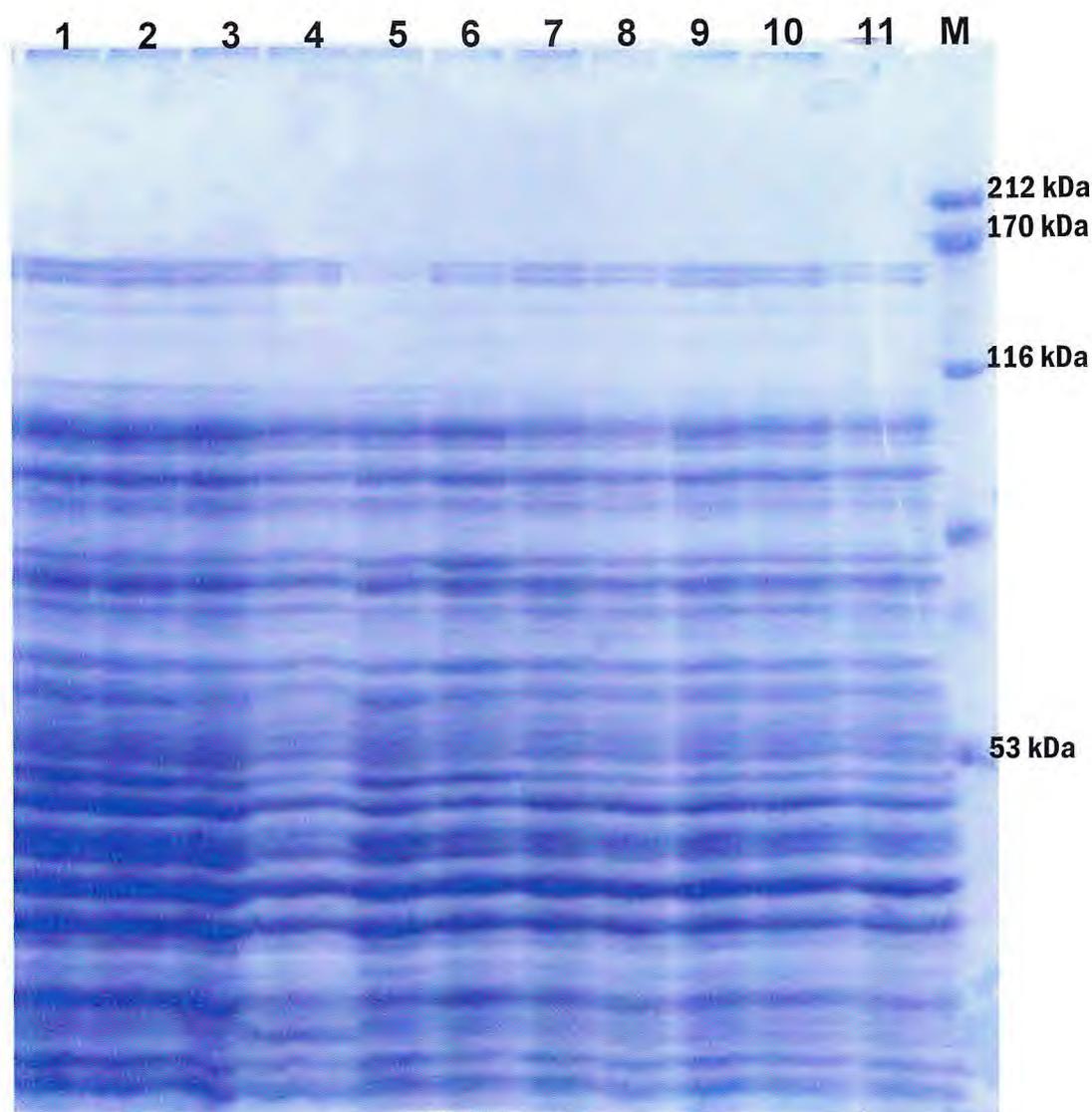


FIGURA 38 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da Fração Solúvel obtida após a lise das células de *E. coli* TOP10 utilizadas como controle ou contendo o inserto CV1887, induzidas com diferentes concentrações de L-arabinose. Amostras: **1.** *E. coli* TOP10 não-induzido, 4 h; **2.** *E. coli* TOP10 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **3.** *E. coli* TOP10-pBAD-C não-induzido, 4 h; **4.** *E. coli* TOP10-pBAD-C induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **5.** *E. coli* TOP10-pBAD/*lacZ* não-induzido, 4 h; **6.** *E. coli* TOP10-pBAD/*lacZ* induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **7.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,00002% de L-arabinose, 4 h; **8.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,0002% de L-arabinose, 4 h; **9.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,002% de L-arabinose, 4 h; **10.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,02% de L-arabinose, 4 h; **11.** *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **M.** Marcador de alto peso molecular.

TABELA 22 – Tempo Médio de Desenvolvimento, Percentual de Emergência e Peso Médio dos insetos alimentados em sementes artificiais com células de *Escherichia coli* TOP10, contendo o gene CV1887.

Tratamentos	TMD¹	%EM²	PM³
Controle	29,75 ± 0,01 c	83,06 ± 7,41 a	3.047 ± 0.40 a
CV 1887 0.5%	31,67 ± 0,58 b	76,60 ± 6,26 a	3.163 ± 0.22 a
CV 1887 1.0%	32,11 ± 0,22 ab	82,90 ± 0,14 a	3.369 ± 0.04 a
CV 1887 2.0%	33,27 ± 0,57 ab	65,70 ± 9,51 a	3.313 ± 0.16 a
CV 1887 4.0%	33,79 ± 0,48 a	67,60 ± 3,74 a	3.066 ± 0.07 a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,005$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média e o desvio padrão entre as repetições.

¹ O tempo médio de desenvolvimento está expresso em número médio de dias.

² O percentual de emergência está expresso em número médio de adultos emergidos/100 ovos.

³ O peso médio dos insetos está expresso em miligramas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida do extrato das células de *E. coli* TOP10, transformadas com o plasmídeo pBAD-C::CV1887 (Figura 40), utilizado no Bioensaio IV, exibiu uma banda na mesma altura daquela observada para o Extrato Insolúvel das células de *E. coli* TOP10 testadas no *screening* da indução com diferentes concentrações de L-arabinose (Figura 37).

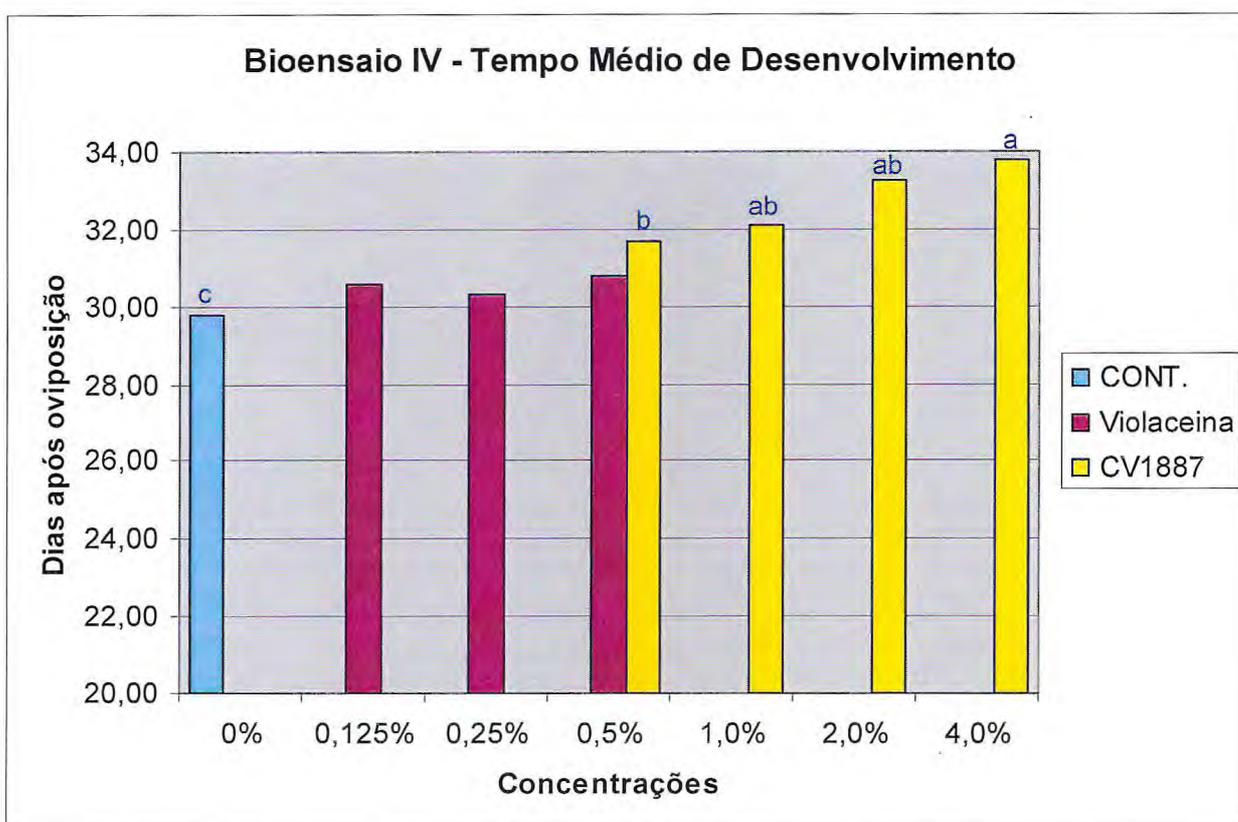


FIGURA 39 – Tempo médio de desenvolvimento dos insetos alimentados com dietas artificiais contendo violaceína ou células de *E. coli* TOP10, transformadas com o plasmídeo pBAD-C::CV1887.

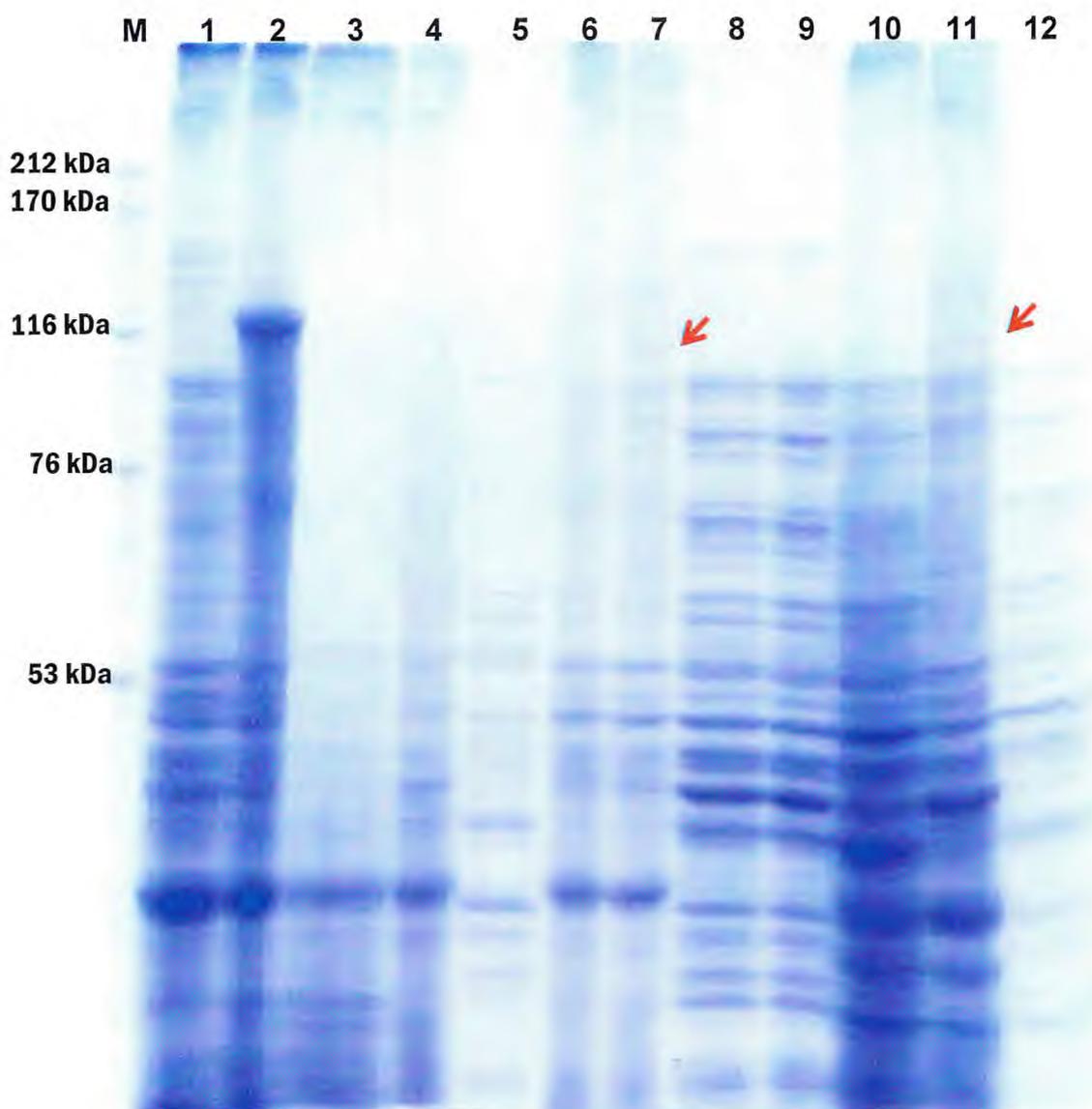


FIGURA 40 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das células de *E. coli* TOP10, transformadas com o plasmídeo pBAD-C::CV1887, utilizadas no Bioensaio IV. As setas vermelhas indicam uma proteína induzida nas frações insolúveis dos extratos de células contendo o plasmídeo pBAD::CV1887. Amostras: **M**. Marcador de alto peso molecular. **1**. Fração Insolúvel de *E. coli* TOP10 pBAD/LacZ, não induzido, 4 h; **2**. Fração Insolúvel de *E. coli* TOP10-pBAD/LacZ induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **3**. Extrato Total de *E. coli* TOP10-pBAD-C induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **4**. Fração Insolúvel de *E. coli* TOP10-pBAD-C induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **5**. Fração Solúvel de *E. coli* TOP10-pBAD-C induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **6**. Fração Insolúvel de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,02% de L-arabinose, 4 h; **7**. Fração Insolúvel de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **8**. Fração Solúvel de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,02% de L-arabinose, 4 h; **9**. Fração Solúvel de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h; **10**. Extrato total de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h (Bioensaio IV); **11**. Fração Insolúvel de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h (Bioensaio IV); **12**. Fração Solúvel de *E. coli* TOP10-pBAD::CV1887 induzido com 0,2% de L-arabinose, 4 h (Bioensaio IV).

7 DISCUSSÃO

A descoberta de Martin *et al.* (2004) de isolados do solo contendo bactérias púrpuras tóxicas para *Leptinotarsa decemlineata*, aliada à identificação de similaridade entre a ORF CV1887 de *C. violaceum* e proteínas bacterianas com atividade inseticida (VASCONCELOS *et al.*, 2003), dão suporte à hipótese testada no presente trabalho, onde foram constatados efeitos detrimenais para o desenvolvimento do inseto *C. maculatus*, exposto à bactéria *C. violaceum*, ou a frações dessa bactéria e, além disso, a células de *E. coli* induzidas para a expressão da proteína recombinante codificada pelo gene CV1887.

A tentativa de identificar a proteína recombinante CV1887 no extrato total de células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pBAD-C::CV1887, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), não ofereceu resultados concretos, uma vez que esperávamos uma proteína induzida com massa aparente de 153 kDa. Proteínas com esse tamanho aproximado também foram observadas nos controles, e investigações adicionais precisam ser conduzidas para confirmar a identidade das bandas observadas nos géis. Minet *et al.* (1999) expressaram em bactérias proteínas YD fusionadas com caudas de Histidina. A proteína contendo uma região com 22 repetições YD da teneurina-1, proteína neuronal de galinhas, foi denominada His-YD₄₋₂₆. Após a indução da produção de His-YD₄₋₂₆ e lise da bactéria em tampão contendo uréia 8 M, não foi observado o aparecimento de proteína recombinante no tamanho esperado nos géis SDS. No entanto, após extensiva sonicação da bactéria neste tampão, uma banda do tamanho esperado de 60 kDa foi visualizada. Concomitante com o aparecimento da banda de proteína de 60 kDa, uma grande quantidade de proteína foi coletada na interface entre o gel de concentração e o gel de separação. Após a purificação da His-YD₄₋₂₆ em uma coluna de afinidade de Ni, não somente a banda de 60 kDa, mas também o material do topo do gel de separação foi recuperado no eluato. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que His-YD₄₋₂₆ forma grandes agregados ou se liga a grandes substâncias da bactéria que não entram no gel, possivelmente a estruturas de carboidratos de alto peso molecular, tais como os polissacarídeos capsulares (JANN; JANN, 1990). É possível que a proteína CV1887 apresente um comportamento similar, complexando-se com carboidratos de alto peso molecular de *E. coli*, o que comprometeria a migração normal dessa proteína no gel SDS, impossibilitando a sua identificação por esse método.

Uma alternativa para verificar essa possibilidade seria tentar dissociar as interações com carboidratos com tampões contendo borato, desde que o borato é capaz de

complexar carboidratos (WEITZMAN *et al.*, 1979). No trabalho de Minet *et al.* (1999), os autores dialisaram a His-YD₄₋₂₆ contra TBE, o que resultou em uma fração solúvel contendo a His-YD₄₋₂₆ e um precipitado, que foi ressolubilizado em tampão contendo uréia 8 M. A fração solúvel contendo His-YD₄₋₂₆ migrou até a localização esperada após SDS-PAGE, enquanto o precipitado ressolubilizado não continha qualquer His-YD₄₋₂₆ capaz de entrar no gel de separação. Após a análise do conteúdo de carboidratos destas frações os autores observaram que a His-YD₄₋₂₆ realmente interage com carboidratos, os quais são muito reduzidos na fração dializada solúvel, enquanto o precipitado é enriquecido desses carboidratos, e a interação com a His-YD₄₋₂₆ é influenciada por borato, assim como por EDTA indicando que cátions divalentes afetam a ligação.

Em uma abordagem paralela a esse raciocínio, foi efetuada a lise das células de *E. coli* TOP10 contendo o plasmídeo pBAD-C com o gene CV1887 da *C. violaceum*, utilizando tampão de lise contendo EDTA, o que revelou uma banda induzida com massa aparente próxima a 116 kDa na fração insolúvel. Sergeant *et al.* (2003), frente à incapacidade de visualizar a proteína XptB1 de *X. nematophilus* em SDS-PAGE, que também contém os motivos com repetições YD, verificou a possibilidade de interação com carboidratos de alto peso molecular, por meio da sonicação de células de *E. coli* expressando XptB1 em uréia 8 M., mas nenhuma proteína pôde ser detectada por SDS-PAGE. No entanto, quando esses autores lisaram as células de *E. coli* contendo XptB1 e analisaram o conteúdo dos lisados por meio de FPLC (*Fast-Performance Liquid Chromatography*) de troca iônica, foi revelada uma proteína de 65 kDa, cuja sequência N-terminal (10 aminoácidos) foi idêntica à sequência predita para XptB1. Sergeant *et al.* (2003) sugerem tratar-se de uma proteína truncada, difícil de detectar por SDS-PAGE. Deste modo, a proteína induzida com cerca de 116 kDa visualizada nos lisados de *E. coli* analisadas no presente trabalho pode corresponder à proteína CV1887, expressa como uma proteína truncada, a exemplo do que foi observado para XptB1.

Outra possibilidade é que a discrepância verificada entre o tamanho observado e o predito para o que foi julgado ser a proteína recombinante CV1887 pode ser consequência de uma migração eletroforética anormal da proteína completa, visto que a migração eletroforética anômala de proteínas em SDS-PAGE é relatada em vários trabalhos. Klenova *et al.* (1997) demonstraram que a proteína CTCF de 82 kDa migra como uma proteína de 130 kDa em SDS-PAGE. Nesse trabalho os autores argumentam que a migração eletroforética anormal da proteína pode estar relacionada com as propriedades dos domínios N- e C-terminal, e que o alto conteúdo de aminoácidos acídicos (26%) do domínio C-terminal da CTCF, o qual confere uma alta carga negativa a essa proteína, pode explicar o

comportamento anômalo em SDS-PAGE. Armstrong e Roman (1993) também atribuem a migração anômala da proteína HPV 16 E7 do papilomavírus (cujas massa relativa baseada na sua composição de aminoácidos é de 11 kDa, enquanto em SDS-PAGE ela migra como uma proteína de 17 kDa), à sua considerável carga líquida negativa. Martín *et al.* (1996) observaram uma migração anômala para a proteína NDH-A, do tilacóide de cevada, que migra como uma proteína menor que a predita com base na sua composição de aminoácidos. Experimentos adicionais, como o seqüenciamento N-terminal da proteína que foi julgado corresponder à CV1887, são necessários para esclarecer a verdadeira natureza da proteína induzida nos experimentos realizados.

As células de *C. violaceum* íntegras exibiram um efeito adverso sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*, retardando em até três dias o tempo que os insetos levaram desde o ovo até a forma adulta. Quando as células de *C. violaceum* foram aquecidas a 100 °C por 30 min, o tempo de desenvolvimento dos insetos aumentou para quase 9 dias, indicando que o tratamento com aquecimento a 100 °C por 30 min foi necessário para liberar das células de *C. violaceum* fatores antibióticos para *C. maculatus*. Quando as células foram lisadas, o “extrato total insolúvel” foi o mais eficaz, retardando o tempo de desenvolvimento dos insetos em torno de 11 dias. No entanto, parte dos fatores antibióticos das células de *C. violaceum* foi provavelmente secretada no meio de cultura, já que o “extrato secretado” foi capaz de retardar o tempo de desenvolvimento dos insetos por quase 2 dias. O “extrato total solúvel” também exibiu parte da atividade observada para *C. violaceum*, retardando cerca de 2 dias o desenvolvimento do inseto. Investigações adicionais são necessárias para verificar se a atividade observada para os três extratos deve-se às proteínas que essas frações têm em comum, ou se as proteínas exclusivas de cada extrato são responsáveis pelas atividades individuais, o que para o extrato secretado pode ser facilitado, desde que essa fração exibe uma proteína preponderante de aproximadamente 30 kDa, cuja natureza deve ser elucidada. Uma combinação dessas hipóteses não pode ser descartada.

Martin *et al.* (2004) verificaram que culturas de *C. suttsuga* foram tóxicas para *L. decemlineata*, e que os sobrenadantes filtrados dessas culturas exibiram entre 9 e 20% da atividade total observada para as células íntegras cultivadas por 48 h à temperatura de 25 °C, com agitação constante a 125 rpm. Os resultados obtidos no presente trabalho, aliados aos resultados observados para *C. suttsuga*, sugerem que as bactérias do gênero *Chromobacterium* possuem múltiplos componentes moleculares envolvidos na toxicidade contra insetos, cujas identidades permanecem elusivas e que, embora a maior parte desses fatores encontre-se associada aos componentes celulares insolúveis, outra parte é secretada ou

encontra-se dissolvida no interior das células de *Chromobacterium*. A violaceína parece não estar envolvida nessa interação, desde que este pigmento, quando extraído de *C. violaceum*, não apresentou qualquer atividade contra larvas de *C. maculatus* em nossos experimentos, a exemplo do que foi observado por Martin *et al.* (2004), com a violaceína extraída de *C. suttsuga* testada contra *L. decemlineata*.

Uma vez que os motivos com repetições YD são comuns em proteínas com domínios transmembranares (Minet *et al.*, 1999), a proteína codificada pela ORF CV1887 de *C. violaceum* pode estar envolvida na atividade antibiótica contra *C. maculatus* observada no presente trabalho, já que o “extrato total insolúvel” foi responsável pela maior atividade observada entre as frações de *C. violaceum* testadas e as sementes artificiais contendo células de *E. coli* transformadas com o gene CV1887, cuja expressão foi induzida com L-arabinose, retardaram o tempo de desenvolvimento de *C. maculatus* em 4 dias. No entanto, não podemos descartar a hipótese de que outros genes estão envolvidos na toxicidade de *C. violaceum* para *C. maculatus*, já que essa bactéria possui uma gama de proteínas potencialmente envolvidas na interação com insetos, como as quitinases e outras proteínas com repetições YD, de acordo com o que foi observado na análise do genoma dessa bactéria (VASCONCELOS *et al.*, 2003). A lectina CV-IIL de *C. violaceum* pode estar envolvida na atividade contra *C. maculatus*, embora a lectina CV-IIL ou suas similares PA-IIL, de *P. aeruginosa* e RS-IIL, de *Ralstonia solanacearum*, não tenham sido datadas como tóxicas para insetos (ZINGER-YOSOVICH *et al.*, 2006).

Proteínas contendo motivos com repetições YD fazem parte dos complexos de genes das toxinas inseticidas *tc*, de *P. luminescens*, *sep*, de *S. entomophila* e *xpt*, de *Xenorhabdus* spp. Quando testadas individualmente, as proteínas YD desses complexos exibem uma baixa atividade inseticida. No entanto, elas são requeridas para a atividade tóxica plena das outras proteínas envolvidas nos complexos (SERGEANT *et al.*, 2003). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam a presença de diferentes fatores tóxicos para *C. maculatus*, dispersos entre as frações de *C. violaceum* analisadas. Investigações adicionais precisam ser realizadas para verificar se as proteínas com repetições YD de *C. violaceum* participam de complexos de proteínas com atividade antibiótica para insetos, análogos aos observados para as três espécies de bactérias citadas. Vale ressaltar que os experimentos conduzidos exibiram um tipo de atividade diferente da observada para o complexo de proteínas tóxicas de *Xenorhabdus* e seus homólogos. Enquanto essas proteínas causam mortalidade nos insetos testados, as proteínas de *C. violaceum* retardam o tempo de desenvolvimento de *C. maculatus*, o que também consiste em uma atividade antibiótica, mas

pode ser um indicativo de mecanismos de ação diferentes para as proteínas de *C. violaceum*. Por outro lado, tais diferenças podem estar associadas com o inseto utilizado como modelo em nossos experimentos, o que só poderá ser constatado com a verificação da toxicidade de *C. violaceum* para as espécies utilizadas nos trabalhos citados, e com a avaliação da toxicidade das outras bactérias para *C. maculatus*. O fato do gene CV1887 de *C. violaceum* exibir uma alta similaridade com uma proteína de *X. bovienii* é condizente com a baixa letalidade observada para as proteínas de *C. violaceum* nos ensaios com *C. maculatus*, desde que *X. bovienii* exibiu uma baixa atividade quando testada contra insetos altamente suscetíveis às toxinas de *X. nematophilus* (SERGEANT *et al.*, 2006).

No sentido de verificar se a eficiência das células de *C. violaceum* pode variar frente a diferentes biótipos de insetos, a atividade inseticida da bactéria foi testada em nosso trabalho contra insetos da espécie *C. maculatus* do Ceará e do Rio Grande do Norte. Os insetos do Rio Grande do Norte se mostraram mais suscetíveis ao efeito das células íntegras de *C. violaceum*, bem como aos efeitos do “extrato total solúvel” e do “extrato secretado”. No entanto, o “extrato total insolúvel” foi igualmente detrimental ao desenvolvimento dos insetos de ambas as origens. Os resultados indicam que a exploração dos fatores tóxicos confinados na fração insolúvel de *C. violaceum* pode ser mais adequada para a efetivação desses componentes no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao *C. maculatus*, desde que a eficiência dos fatores presentes nas demais frações parece variar entre diferentes populações deste inseto. Por outro lado, os resultados afirmam a necessidade do uso de diferentes fontes de compostos com atividade inseticida no combate às pragas agrícolas e para insetos envolvidos em patologias humanas e animais, visto que a resposta diferencial das populações de *C. maculatus* analisadas no presente trabalho alerta para o potencial de desenvolvimento de resistência a fatores antibióticos por diferentes biótipos de insetos.

Para avaliar o efeito de *C. violaceum* sobre a fecundidade dos adultos de *C. maculatus* expostos a células e a frações obtidas a partir da lise das células dessa bactéria, o desempenho dos insetos emergidos de sementes artificiais foi avaliado em sementes de *V. unguiculata* suscetíveis ao “caruncho”. Os resultados obtidos indicam que os insetos desenvolvidos em sementes artificiais não foram afetados pela dieta contendo células de *C. violaceum*, o que se pode afirmar, levando em conta que nenhuma diferença significativa foi observada para o desempenho desses insetos nas sementes de *V. unguiculata*. Em outras palavras, a progênie dos insetos que infestaram as sementes artificiais contendo células de *C. violaceum* foi capaz de ovipositar normalmente em sementes de feijão-de-corda, gerando larvas saudáveis, que eclodiram e se desenvolveram no interior das sementes em um tempo

usual para a espécie, culminando na emergência de adultos saudáveis. Desempenhos similares foram observados entre os insetos oriundos do Ceará e do Rio Grande do Norte, sugerindo que a ausência dos efeitos dos fatores antibióticos de *C. violaceum* na fecundidade dos insetos expostos a células da bactéria é independente do biótipo de *C. maculatus* testado. A mesma análise, realizada com a progênie obtida a partir dos insetos alimentados com os lisados de *C. violaceum*, não revelou nenhum efeito detrimental ao desenvolvimento de *C. maculatus* entre as frações testadas. A diferença observada entre o percentual de eclosão das larvas geradas por insetos do Ceará, que foi menor para os insetos alimentados somente com farinha de feijão-de-corda, quando comparados com os insetos alimentados com os três extratos (ETS, SEC e ETI) de *C. violaceum*, pode ser fruto de diferenças genótípicas entre os indivíduos testados, características da espécie. A constituição genotípica dos indivíduos testados pode estar envolvida também na diferença observada entre os insetos do Ceará e do Rio Grande do Norte, para o percentual de eclosão das larvas geradas por insetos criados nas frações do “extrato total insolúvel” de *C. violaceum*. O que reforça tal especulação é o fato de que os valores encontrados para essas variáveis não foram diferentes daqueles encontrados para os insetos alimentados com cápsulas artificiais contendo apenas farinha de sementes de *V. unguiculata*.

8 CONCLUSÃO

As células de *C. violaceum* íntegras retardaram o tempo de desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*, originados do Ceará e do Rio Grande do Norte. Os insetos do Ceará foram mais suscetíveis que os do Rio Grande do Norte, exibindo uma resposta diferenciada de duas populações de *C. maculatus* que aponta para o risco do desenvolvimento de resistência a fatores antibióticos por biótipos da espécie.

As células de *C. violaceum* aquecidas a 100 °C por 30 minutos retardaram o tempo de desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*, originados do Ceará, em uma proporção maior que a observada para as células íntegras, indicando que os fatores antibióticos presentes na bactéria possivelmente foram liberados após o aquecimento.

Após a lise das células de *C. violaceum*, o “extrato total insolúvel” foi o mais eficiente em retardar o tempo de desenvolvimento de *C. maculatus*, originados do Ceará e do Rio Grande do Norte. O “extrato secretado” e o “extrato total solúvel” também retardaram, em uma proporção menor, o tempo de desenvolvimento de *C. maculatus*, do Ceará e do Rio Grande do Norte. Os insetos do Rio Grande do Norte foram mais suscetíveis ao “extrato secretado” e ao “extrato total solúvel”, mas igualmente suscetíveis ao “extrato total insolúvel”.

As células e as frações obtidas após a lise de células de *C. violaceum*, não exibiram efeito sobre a fecundidade da progênie alimentada em sementes artificiais enriquecidas com os extratos de *C. violaceum*.

A violaceína não exibiu nenhum efeito inseticida sobre larvas de *C. maculatus*, sugerindo que outros fatores presentes em células e extratos celulares de *C. violaceum* são responsáveis pela antibiose verificada.

As células de *E. coli* TOP10, transformadas com o plasmídeo pBAD-C contendo o inserto CV1887, retardaram o tempo de desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* em todas as concentrações testadas, o que sugere a participação do gene CV1887 nos efeitos deletérios observados nos bioensaios. Uma investigação mais aprofundada é necessária para identificar a natureza bioquímica de outros fatores antibióticos que podem estar envolvidos na toxicidade de *C. violaceum* verificada para o bruchídeo *C. maculatus*.

As informações obtidas nos experimentos realizados neste trabalho são fundamentais para o entendimento dos mecanismos bioquímicos envolvidos na toxicidade de bactérias para insetos do gênero *Chromobacterium*, bem como de bactérias contendo proteínas com motivos YD.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. (1997). Plant pathology. **San Diego: Academic Press.** 635 p.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, **215(3)**: 403-410.
- ANDERSON, P. M.; SUNG, Y. C., FUCHS, J. A. (1990). The cyanase operon and cyanate metabolism. **FEMS Microbiol. Rev.**, **7**: 247-252.
- ARMSTRONG, D.J., ROMAN, A. (1993). The anomalous electrophoretic behavior of the huma papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **192(3)**: 1380-1387.
- ARONSON, A.I.; BECKMAN W., DUNN, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.**, **50**: 1-24.
- ATKINSON, H.J.; URWIN, P.E.; McPHERSON, M.J. (2003). Engineering plants for nematode resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, **41**: 615-639.
- AUGUST, P.R.; GROSSMAN, T.H.; MINOR, C.; DRAPER, M.P.; MACNEIL, I.A.; PEMBERTON, J.M.; CALL, K.M.; HOLT, D.; SOSBURNE, M.S. (2000). Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, **2**: 513-519.
- BALLANTINE, J.A.; BEER, R.J.S.; CRUTCHLEY, D.J.; DODD, G.M., PALMER, D.R. (1958). The synthesis of violacein and related compounds. **Proc. Chem. Soc.** p. 232-233.
- BARRETO, P.D., QUINDERÉ, M.A.W. (2000). Resistência de genótipos de caupi ao caruncho. **Pesq. Agropec. Bras.**, **35(4)**: 779-785.
- BASTOS, J.A.M. (1973). Avaliação dos prejuízos causados pelo gorgulho, *Callosobruchus maculatus*, em amostras de feijão-de-corda, colhidas em Fortaleza-Ceará. **Pesq. agropec. Bras.**, **8**: 131-132.
- BASTOS, J.A.M. (1988). Principais pragas das culturas e seus controles. **São Paulo: Nobel.** v. 3, p. 149-151.
- BEINERT, H. (1991). Copper in biological systems - A report from the 6th Manziana conference. **J. Inorg. Biochem.**, **44**: 173-218.
- BERGONZINI (C.). (1881). Sopra un nuovo bacterio colorato. **Annuaire Soc. Nat. Modena**, Series 2, v. 14, p. 149-158.
- BILTON, B.D.; JOHNSON, L.W. (2000). Recurrent nonfatal *Chromobacterium violaceum* infection in a nonimmunocompromised patient. **Infect. Med.**, **17**: 686-692.

BIRD, D. M.; OPPERMAN, C.H.; DAVIES, K.G. (2003). Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. **Int. J. Parasitol.**, **33**: 1269-1276.

BLACKBURN, M.; GOLUBEVA, E.; BOWEN, D.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. (1998). A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *manduca sexta*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64(8)**: 3036-3041.

BOISBAUDRAN, L.D. (1882). Matière colorante se formant dans la cole de farine. **Compt. Rend.**, **94**: 562.

BOLCHERS, R.; ACKERSON, C.W.; KIMMET, L. (1947). Trypsin inhibitor. IV. Occurrence in seeds of the Leguminosae and other seeds. **Arch. Biochem.**, **13**: 291-293.

BOWEN, D.; ROCHELEAU, T. A.; BLACKBURN, M.; ANDREEV, O.; GOLUBEVA, E.; BARTHIA, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. (1998). Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Science**, **280**: 2129-2134.

BOWEN, D.J., ENSIGN, J.C. (1998). Purification and characterization of a high-molecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64(8)**: 3029-35.

BRAGA, Y.F.B.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; LOPES, H.L.; BEZERRA, J.N.S.; ANDRADE-NETO, M.; LIMA, M.A.S. (2007). Insecticidal activity of 2-tridecanone against the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **79(1)**: 1-5.

BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; BORTOLI, S.A. (2006). Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, **6(1)**: 96-103.

BUCHANAN, R.E. (1917). Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. V. subgroups and genera of the bacteriaceae. **The Journal of Bacteriology**, **3(1)**: 52.

BUCHER, G.E. (1981). Identification of bacteria found in insects, p. 7-33. In: H.D. Burges (ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. **Academic Press, New York**.

CAJAZEIRAS, J.B. (2000). Identificação de genótipos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] resistentes ao gorgulho (*Callosobruchus maculatus* Fabr., 1792). Dissertação de Mestrado DBBM/UFC, 92p.

CALDAS, L.R. (1990). Um pigmento nas águas negras. **Cienc. Hoje** **11**: 55-57.

CALDAS, L.R.; LEITÃO, A.A.C.; SANTOS, S.M.; TYRRELL, R.M. (1978). Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. In: Proceedings of the International Symposium on Current Topics in Radiology and Photobiology (Tyrrell, R.M., ed.). **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, pp.121-126.

CAMPBELL, S. C.; OLSON, G. J.; CLARK, T. R.; MCFETERS, G. (2001). Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, **26**: 134-139.

CARVALHO, J.P.; MACHADO, M.U.M. (1967). A entomofauna dos produtos armazenados. Contribuição para o estudo do *Callosobruchus maculatus* (Col. Bruchidade). **Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais**. v. XI, p. 133-240.

CASTLE, L.A.; WU, G.; McELROY, D. (2006). Agricultural input traits: past, present and future. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **17**(2): 105-12.

CHARLES, J.F.; NIELSEN-LEROUX, C. (2000). Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **95**(1): 201-6.

CHEN, G.; ZHANG, Y.; LI, J.; DUNPHY, G. B.; PUNJA, Z. K.; WEBSTER, J. M. (1996). Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. **J. Invertebr. Pathol.**, **68**: 101-108.

CHITWOOD, D.J. (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. **Pest Manag.Sci.**, **59**: 748-753.

CRUZ, C.D. (2001). Programa GENES – Versão Windows. Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. 1ª. ed. Viçosa, MG. **Editores UFV**. v. 1. 648 p.

DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J., BRIGHT, P.L. (1989). *Chromobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Neisseria*, *Simonsiella*, and *Vitreoscilla* species comprise a major branch of the beta-group proteobacteria by 16S ribosomal ribonucleic-acid sequence comparison-transfer of *Eikenella* and *Simonsiella* to the family Neisseriaceae (emend.). **Intern. J. System. Bacteriol.**, **39**: 258-266.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin.**, **19**(1): 11-15.

DUCHAUD E.; RUSNIOK C.; FRANGEUL L.; BUCHRIESER C.; GIVAUDAN A.; TAOURIT S.; BOCS S.; BOURSAUX-EUDE C.; CHANDLER M.; CHARLES J.F.; DASSA E.; DEROSE R.; DERZELLE S.; FREYSSINET G.; GAUDRIAULT S.; MEDIGUE C.; LANOIS A.; POWELL K.; SIGUIER P.; VINCENT R.; WINGATE V.; ZOUINE M.; GLASER P.; BOEMARE N.; DANCHIN A.; KUNST F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nat Biotechnol.**, **21**(11): 1307-13.

DURÁN, N. (1990). Violaceína: A descoberta de um antibiótico. **Ciencia Hoje.**, **11**: 58-60.

DURÁN, N., HAUN, M. (1997). Processo de produção, obtenção, purificação e atividade antitumoral de 3-[1,2-diidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-diidro-2H-indol-2-ona. **Patente Bras.** PIBr. 9702918.

DURÁN, N.; ANTONIO, R.V.; HAUN, M.; PILLI, R.A. (1994). Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **10**: 686-690.

DURÁN, N.; ERAZO, S.; CAMPOS, V. (1983). Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, **55**: 231-234.

DURAN, N.; MENCK, C.F. (2001). *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Crit. Rev. Microbiol.**, **27**: 201-222.

DURAN, N.; RETTORI, D.; MENCK, C.F.M. (2001). Quem é a *Chromobacterium violaceum*? Perspectivas farmacológicas e industriais na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.20, maio/junho, p. 38-43.

DUTKY, S.R. (1940). Two new spore-forming bacteria causing milky diseases of Japanese beetle larvae. **J. Agric. Res.**, **61**: 57-68.

EDDE, P.A.; AMATOBI, C.I. (2000). Relative resistance of some cowpea varieties to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera:Bruchidae). **Journal of Sustainable Agriculture**, **17(2-3)**: 67 - 77.

ENSIGN, J. C.; D. J. BOWEN; PETTEL, J.; FATIG, R.; SCHOONOVER, S.; FFRENCH-CONSTANT, R.H.; ROCHELEAU, T.; BLACKBURN, M.B.; HEY, T.D.; MERLO, D.J.; ORR, G.L.; ROBERTS, J.L.; STRICKLAND, J.A.; GUO, L.; CICHE, T. (1997). Insecticidal protein toxins from *Photorhabdus*. Patent WO 97/17432. **World Intellectual Property Organization**, Geneva, Switzerland.

FATUNLA, T.; BADARU, K. (1983). Resistance of cow-pea pods to *Callosobruchus maculatus* Fabr. **The Journal of Agricultural Science**, **100**: 205-209.

FERRO, D.N., SLOCOMBE, A.C.; MERCIER, C.T. (1997). Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae): residual mortality and artificial weathering of formulated *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis*. **J. Econ. Entomol.**, **90**: 574-582.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M. (2004). Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **15(2)**: 155-61.

FEULNER, G.; GRAY, J. A.; KIRSCHMAN, J. A.; LEHNER, A. F.; SADOSKY, A. B.; VLAZNY, D. A.; ZHANG, J.; ZHAO, S.; HILL, C. W. (1990). Structure of the *rhsA* locus from *Escherichia coli* K-12 and comparison of *rhsA* with other members of the *rhs* multigene family. **J. Bacteriol.**, **172**: 446-456.

FFRENCH-CONSTANT, R., WATERFIELD, N. (2005). An ABC Guide to the Bacterial Toxin Complexes. **Adv. Appl. Microbiol.**, **58C**: 169-183.

FIRMINO, F.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.; GOMES, V.M.; MIRANDA, M.R.A.; DOMINGUES, S.J.S.; XAVIER-FILHO, J. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **29**: 749-756.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMP, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, **269**: 496–512.

FOSTER, S.J. (1993). Molecular analysis of three major wall-associated proteins of *Bacillus subtilis* 168: evidence for processing of the product of a gene encoding a 258 kDa precursor two-domain ligand-binding protein. **Mol. Microbiol.**, **8(2)**: 299-310.

FUKAMIZO, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. **Curr. Protein Pept. Sci.**, **1(1)**: 105-24.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.; BATISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D. (1998). Manual de Entomologia Agrícola. **Ed. Agronômica Ceres**, 2a. ed., 649 p.

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

GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; DOBIE, P.; KILMINSTER, A.M.; BOULTER, D. (1979). Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **J. Sci. Food Agric.**, **30**: 948-958.

GELMAN, D.B.; MARTIN, P.A.; BLACKBURN, M.B.; HU, J.S. (2005). *Chromobacterium subtsuga* insecticidal effects on crop pests. **National Entomological Society of America Annual Meeting**. Ft. Lauderdale, FK.

GRIMONT, A.D.; GRIMONT, F. (1978). The genus *Serratia*. **Ann. Rev. Microbiol.**, **32**: 221-248.

GULIG, P. A.; CALDWELL, A. L.; CHIODO, V. A. (1992). Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. **Mol. Microbiol.**, **6**: 1395–1411.

GURR, S.J.; RUSHTON, P.J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? **Trends Biotechnol.**, **23(6)**: 275-82.

HACKETT, K.J.; WHITCOMB, R.E.; CLARK, T.B.; HENEGAR, R.B.; LYNN, D.E.; WAGNER, A.G.; TULLY, J.G.; GASPARICH, G.E.; ROSE, D.L.; CARLE, P. (1996). *Spiroplasma leptinotarsae* sp. nov., a mollicute uniquely adapted to its host, the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera:Chrysomelidae). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **46**: 906-911.

HARMSSEN, D.; SINGER, C. (1999). *Chromobacterium violaceum* strain DMS 30191 16S and 23S ribosomal RNA genes. **NCBI Nucleotide**. AF124618; AJ247211.

HEIL, M., BOSTOCK, R.M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Ann. Bot.**, **89(5)**: 503-12.

HOSHINO, T. (1999). *Chromobacterium violaceum* violacein biosynthesis gene cluster (vioABCD). **NCBI-Protein**. BAA84782-84785; AF172851; AB032799.

HOWE, R.W.; CURRIE, J.E. (1964). Some laboratory observations on the rates of development, mortality and ovipositions of several species of Bruchidae breeding in stored pulses. **Bull. Entomol. Res.**, **55**: 437-477.

HUESING, J.E.; SHADE, R.E.; CHRISPPEELS, M.J.; MURDOCK, L.L. (1991). α -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean to cowpea weevil. **Plant Physiol.**, **96**: 993-996.

HUISMAN, G.W.; PEOPLES, O.P.; SKRALY, F. (2000). Microbes with polyhydroalkanoate (PHA) biosynthesis genes integrated into their chromosome and method for producing PHAs and screening for PHA genes. PCT Int. Appl. WO 2000011188 A1. **Chem. Abstr.** 132, 205399.

HURST, M.R.; GLARE, T.R.; JACKSON, T.A. (2004) Cloning *Serratia entomophila* antifeeding genes - a putative defective prophage active against the grass grub *Costelytra zealandica*. **J. Bacteriol.**, **186(15)**: 5116-5128.

HURST, M.R.; GLARE, T.R.; JACKSON, T.A.; RONSON, C.W. (2000). Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photorhabdus luminescens*. **J. Bacteriol.**, **182(18)**: 5127-5138.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (2007). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**.

ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. (1989). Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on three species of bruchids (*Coleoptera: Bruchidae*). **Appl. Ent. Zool.**, **24**: 281-286.

JACKSON, T.A.; HUGER, A.M.; GLARE, T.R. (1993). Pathology of amber disease in the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica* (Coleoptera:Scarabidae). **J. Invertebr. Pathol.**, **61**: 123-130.

JAMES, C. (2006). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. **ISAAA Brief** No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.

JANN, B.; JANN, K. (1990). Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **150**: 19-42.

JANSSEN, D. B.; PRIES, F.; VAN DER PLOEG, J. R. (1994). Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. **Annu. Rev. Microbiol.**, **48**: 163-191.

JANZEN, D.H.; JUSTER, H.B.; LIENER, L.E. (1976). Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. **Science**, **192**: 795-796.

- KADER, A.A. (2005). Increasing food availability by reducing postharvest quality and safety of fresh produce. **ISSH Acta Horticulturae**, **682**: 2169-2175.
- KAUR, S. (2006). Molecular approaches for identification and construction of novel insecticidal genes for crop protection. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **22(3)**: 233-253.
- KAYA, H.K.; GAUGLER, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. **Annu. Rev. Entomol.**, **38**: 181-206.
- KÉITA, S.M.; VINCENT, C.; SCHIMIT, J.P.; ARNASON, J.T.; BÉLANGER, A. (2001). Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, **37**: 339-349.
- KITCH, L.W.; SHADE, R.E.; MURDOCK, L.L. (1991). Inheritance of resistance to infestation with azuki bean weevil in *Vigna sublobata* and successful incorporation to *V. radiata*. **Japanese Journal of Breeding**, **38**: 459-464.
- KLEBA, J.B. (1998). Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, **15(3)**: 9-42.
- KLENOVA, E.M.; NICOLAS, R.H.; SALLY, U.; CARNE, A.F.; LEE, R.E.; LOBANENKOV, V.V.; GOODWIN, G.H. (1997). Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. **Nucleic Acids Research**, **25(3)**: 466-473.
- KOGAN, M.; ORTMAN, E.F. (1978). Antixenosis – a new term proposed to define Painter's 'Nonpreference' modality of resistance. **Bull. Entomol. Soc. Amer.**, **24**: 175-176.
- KOLIBACHUK, D.; DENNIS, D. SoxR homolog [*Chromobacterium violaceum*]. **NCBI-Protein** AAC69613; AF061445.
- KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. (1999). Cloning, molecular analysis and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**: 3561-3565.
- KONZEN, M.; DE MARCO, D.; CORDOVA, C.A.S.; VIEIRA, T.O.; ANTÔNIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASAA, T.B. (2006). Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **14**: 8307-8313.
- LAEMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227(5259)**: 680-685.
- LALE, N.E.S.; ABDULRAHMAN, H.T. (1999). Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil obtained by different methods and neem powder for the management of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. **Journal of Stored Products Research**, **35(2)**: 135-143.

LAMB, C.J.; RYALS, J.A.; WARD, E.R.; DIXON, R.A. (1992). Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. **Biotechnology (N Y)**, **10(11)**: 1436-1445.

LARA, F.M. (1991). Princípios de resistência de plantas a insetos. **São Paulo: Ícone**. v. 2. 336 p.

LATTASCH, H.; THOMSON, R. H. J. **Chem. Soc. Perkin Trans. 2** 1984, 1331. Citado por KONZEN, M. *et al.* (2006). Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **14**: 8307–8313.

LAVILLE, J.; BLUMMER, C.; VON SCHROETTER, C.; GAIA, V.; DE FAGO, G.; KEEL, C.; HAAS, D. (1998). Characterization of the *hcnABC* Gene Cluster Encoding Hydrogen Cyanide Synthase and Anaerobic Regulation by ANR in the Strictly Aerobic Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO. **J. Bacteriol.**, **180**: 3187–3196.

LEE, S.C.; STOILOVA-McPHIE, S.; BAXTER, L.; FÜLÖP, V.; HENDERSON, J.; RODGER, A.; ROPER, D.I.; SCOTT, D.J.; SMITH, C.J.; MORGAN, A.W. (2007). Structural characterization of the insecticidal toxin XptA1, reveals a 1.15 MDa tetramer with a cage-like structure. **J.Mol.Biol.** doi:10.1016/j.jmb.2006.12.057

LEININGER, E.; ROBERTS, M.; KENIMER, J. G.; CHARLES, I. G.; FAIRWEATHER, N.; NOVOTNY, P.; BRENNAN, M. J. (1991). Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence to mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**:345–349.

LEITE, Y.F.M.M.; SILVA, L.M.C.M.; AMORIM, R.C.N.; FREIRE, E.A.; JORGE, D.M.M.; GRANGEIRO, T.B.; BENEVIDES, N.M.B. (2005). Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornate* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, **1724**: 137-145.

LEON, L.L.; MIRANDA, C.C.; SOUZA, A.O; DURÁN, N. (2001). Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **J. Antimicrob. Chem.**, **48**: 449-450.

LIBBY, S. J.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A.; ALLEN, C.; WHITFORD, H. A.; BUCHMEIER, N. A.; BOSSIE, S.; GUINEY, D. G. (1997). The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. **Infect. Immun.**, **65**: 1786–1792.

LICHSTEIN, H.C.; VAN DE SAND, V.F. (1945). Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **J. Infect Dis.**, **76**: 47–51.

LIMA, M.P.L., OLIVEIRA, J.V., BARROS, R.B., TORRES, J.B., GONÇALVES, M.E.C. (2001). Estabilidade da resistência de genótipos de caupi a *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) em gerações sucessivas. **Scientia Agricola**, **59(2)**: 275-280.

- LIU, D., BURTON, S., GLANCY, T., LI, Z.S., HAMPTON, R., MEADE, T., MERLO, D.J. (2003). Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. **Nat. Biotechnol.**, **21(10)**: 1222-1228.
- MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, **37**: 409-433.
- MACEDO, M.L.R; ANDRADE, L.B.S.; MORALES, R.A.; XAVIER-FILHO, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, **105**: 89-94.
- MARTÍN, M.; CASANO, L.M.; SABATER, B. (1996). Identification of the Product of *ndhA* Gene as a Thylakoid Protein Synthesized in Response to Photooxidative Treatment. **Plant Cell Physiol.**, **37(3)**: 293-298.
- MARTIN, P.A.; GELMAN, D.B.; BLACKBURN, M.B.; HORISE, E.; ALDRICH, J.R. (2003). *Chromobacterium suttusa*: purple bacteria toxic to pest insects in the orders coleoptera, lepidoptera, hemiptera/homoptera, and heteroptera. **American Society for Microbiology**. v. 104.
- MARTIN, P.A.W.; BLACKBURN, M.; SHROPSHIRE A.D.S. (2004). Two new bacterial pathogens of Colorado potato beetle (Coleoptera : Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.**, **97(3)**: 774-780.
- MATZ, C.; DEINES, P.; BOENIGK, J.; ARNDT, H.; EBERL, L.; KJELLEBERG, S.; JÜRGENS, K. (2004). Impact of Violacein-Producing Bacteria on Survival and Feeding of Bacterivorous Nanoflagellates. **Applied and Environmental Microbiology**, **70(3)**: 1593-1599.
- MBATA, G.N. (1993). Evaluation of susceptibility of varieties of cowpea to *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus subbinotatus* (Pic) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of stored products research.**, **29**: 207-213.
- MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. (2000). In Vitro Cell. **Dev. Biol. Anim.**, **36**: 539-543.
- MINET A.D.; RUBIN B.P.; TUCKER, R.P.; BAUMGARTNER, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. (1999). Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene Ten-m, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. **J. Cell Sci.**, **112**: 2019-2032.
- MINET, A.D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. (2000). Phylogenetic analysis of teneurin genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of *E. coli*. **Gene**, **257(1)**: 87-97.
- MOAR, W.J. (2003) Breathing new life into insect-resistant plants. **Nat. Biotechnol.**, **21(10)**: 1152-1154.

MOMEN, A.Z.M.R.; HOSHINO, T. (2000). Biosynthesis of violacein intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxyindole side. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **64**: 539-549.

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

NOGUEIRA, N.A.P. (1999). Purificação e caracterização biológica da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli*. Tese de Doutorado. **Universidade Federal do Ceará**.

OHBA, M.; IWAHANA, H.; ASANO, S.; SUZUKI, N.; SATO, R.; HORI, H. (1992). A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japanensis* with a high larvicidal activity for scarabaeid beetles. **Lett. Appl. Microbiol.**, **14**: 54-57.

OLIVEIRA, J.V. (1971). Ataque do *Callosobruchus* no feijão comercializado em Fortaleza-Ceará-Brasil. **B. Soc. Cult. Recr. Eng. Agrôn. Mossoró**, **2**: 18-21.

OLIVEIRA, J.V.; SILVA, L.P.; PEREIRA, J.L.L.; TEIXEIRA, L.L.C. NETTO, R.A.C. (1984). Influência de óleos vegetais na viabilidade de ovos e emergência de adultos de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) em feijão de *Vigna unguiculata* Walp. In: **Congresso brasileiro de entomologia**. Londrina-Pr. v. 9, p. 145, 1984.

ONISHI, A.; LIOTTA, L.J.; BENKOVIC, S.J. (1991). Cloning and expression of *Chromobacterium violaceum* phenylalanine hydroxylase in *Escherichia coli* and comparison of amino acid sequence with mammalian aromatic amino acid hydroxylases. **J. Biol. Chem.**, **266**: 18454-18459.

ONSTAD, D.W. (2001). EDWIP: Ecological Database of the World's Insect Pathogens. **Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey**, [15/10/2001]. <http://insectweb.inhs.uiuc.edu/Pathogens/EDWIP/index.html>.

OSUJI, F.N.C. (1976). A comparison of the susceptibility of cowpea varieties to infestation by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae). **Ent. Exp. Appl.**, **20**: 209-217.

PAINTER, R.H. (1968). Insect Resistance in Crop Plants. **Lawrence: The University Press of Kansas**. 2a. ed. 520 p. Citado por LARA, F.M. (1991). Princípios de resistência de plantas a insetos. v. 2. 336 p.

PEMBERTON, J.M.; VINCENT, K.M.; PENFOLD, R.J. (1991). Cloning and heterologous expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. **Curr. Microbiol.**, **22**: 355-358.

PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; PETERSON, L.J.; PARKER, G.B.; McPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISHCHOFF, D.A. (1993). Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetle. **Plant Mol. Biol.**, **22**: 313-321.

REIS, C.M.; CALVET, M.M.; SALES, M.P.; FERNANDES, K.V.S.; GOMES, V.M.; XAVIER-FILHO, J. (1997). α -amylase inhibitors of legume seeds and their involvement in the resistance to bruchid beetles. **Arq. Biol. Tecn.**, **40**: 413-418.

RELMAN, D. A.; DOMENIGHINI, M.; TUOMANEN, E.; RAPPUOLI, R.; FALKOW, S. (1989). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **86**: 2637-2641.

RETTORI, D. (2000). Produção, extração e purificação da violaceína : Um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*. Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP.

ROMLING, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Res. Microbiol.**, **153**: 205-212.

SADOSKY, A.B.; GRAY, J.A.; HILL, C.W. (1991). The RhsD-E subfamily of *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Res.**, **19(25)**: 7177-7183.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2a. ed. 253 p.

SANTOS, J.H.R. (1971). Aspectos da biologia do *Callosobruchus maculatus* sobre sementes de *Vigna sinensis*. Dissertação de mestrado. **Escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba-sp. p. 05.

SANTOS, J.H.R.; QUINDERÉ, M.A.W. (1988). Distribuição, importância e manejo das pragas do caupi no Brasil. In: Araújo, J.P.P. de., WATT, E.E. (eds.) O caupi no Brasil. Brasília: **IITA/EMBRAPA**, 1988, cap. 21, p. 607-658.

SANTOS, J.H.R.; VIEIRA, F.V. (1971). Influência sobre o poder germinativo de sementes do cv. Seridó. **Ci. Agron.**, **1(2)**: 71-74.

SERGEANT, M.; BAXTER, L.; JARRETT, P.; SHAW, E.; OUSLEY, M.; WINSTANLEY, C.; MORGAN, A.W. (2006). Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the *xpt* toxin loci. **Applied and Environmental Microbiology**, **72(9)**: 5895-5907.

SERGEANT, M.; JARRETT, P.; OUSLEY, M.; MORGAN, J.A.W. (2003). Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. **Applied and Environmental Microbiology**, **69(6)**: 3344-3349.

SHIRATA, A.; TSUKAMOTO, T.; YASUI, H.; HATA, T.; HAYASAKA, S.; KOJIMA, A.; KATO, H. (2000). Isolation of bacteria producing bluishpurple pigment and use for dyeing. **Japan Agric. Res. Quart.**, **34**: 131-140.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; LIMA, R.M. (2001). Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Arch. Insect Biochem Physiol.**, **47(1)**: 18-28.

SILVA, P.H.S.; CARNEIRO, J.S. (2000). Pragas do Feijão Caupi e seu Controle. In: CARDOSO, M.J. (Org.). (2000). A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil. Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, 264 p. Cap. 9, pp 187-226.

SINGH, S.R.; ALLEN, D.J. (1980). Pest, diseases, resistance and protection in cowpeas. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUTING, A.H. (eds.) *Advances in legume science*. p. 419, 1980.

SINGH, U.; SINGH, B. (1992). Tropical grain legumes as important humans foods. **Economic Botany**, **46**: 310-321.

SMITH, A. D.; HUNT, R. J. (1985). Solubilization of gold by *Chromobacterium violaceum*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, **35**: 110-116.

SOUTHGATE, B.J.; HOWE, R.W.; BRETT, G.A. (1957). The specific status of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus analis* (F.). **Bulletim of Entomological Research**, **48**: 79-78.

SOUZA, A.O.; AILY, D.C.G.; SATO, D.N.; DURÁN, N. (1999). Atividade da violaceína *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **58**: 59-62.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; JORDAN, L.; ELY, S. (1992). Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, **6(9)**: 1211-1217.

TUCKER, R.P.; KENZELMANN, D.; TRZEBIATOWSKA, A.; CHIQUET-EHRISMANN, R. (2007). Teneurins: Transmembrane proteins with fundamental roles in development. **The International Journal of Biochemistry & Cell.**, **39**: 292-297.

UEDA, H.; NAKAJIMA, H.; HORI, Y.; GOTO, T.; OKUHARA, M. (1994). Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH373 cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **58**: 1579-1583.

VASCONCELOS, A.T.R.; ALMEIDA D.F.; HUNGRIA, M.; GUIMARÃES C.T.; ANTONIO, R.V.; ALMEIDA, F.C.; ALMEIDA, L.G.P.; ALMEIDA, R.; ALVES-GOMES J.A.; ANDRADE, E.M.; ARARIPE, J.; ARAÚJO, M.F.F.; ASTOLFI, S.; AZEVEDO V.; BAPTISTA, A.J.; BATAUS, L.A.M.; BATISTA, J.D.; BELO, A.; VAN DEN BERG, C.; BOGO, M.; BONATTO, S.; BORDIGNON, J.; BRIGIDO, M.M.; BRITO, C.A.; BROCCHI, M.; BURITY, H.A.; CAMARGO, A.A.; CARDOSO, D.D.; CARNEIRO, N.P.; CAVADA, B.S.; CHUEIRE, L.M.O.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; DA CUNHA, N.C.; FAGUNDES, N.; FALCÃO, C.L.; FANTINATTI, F.; FARIAS, L.P.; FELIPE, M.S.S.; FERRARI, L.P.; FERRO, J.A.; FERRO, M.T.; FRANCO, G.R.; DE FREITAS, N.S.A.; FURLAN, L.R.; GAZZINELLI, R.T.; GOMES, E.A.; GONÇALVES, P.R.; GRANGEIRO, T.B.; GRATTAPAGLIA, D.; GRISARD, E.C.; HANNA, E.S.; JARDIM, S.N.; LAURINO, J.; LEOI, L.C.T.; LIMA, L.F.A.; LOUREIRO, M.D.; DE LYRA, M.D.C.P.; MADEIRA, H.M.F.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINS, W.S.; DI MAURO, S.M.Z.; DE MEDEIROS, S.R.B.; MEISSNER, R.D.; MOREIRA, M.A.M.; DO NASCIMENTO, F.F.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, J.G.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXÃO, R.F.C.; PARENTE, J.A.; PEDROSA, F.D.P.; PENA, S.D.J.; PEREIRA, J.O.; PEREIRA, M.; PINTO, L.S.C.; PINTO, L.D.; PORTO, J.I.R.; POTRICH, D.P.; RAMALHO-NETO, C.E.; REIS, A.M.M.; RIGO,

L.U.; RONDINELLI, E.; DO SANTOS, E.B.P.; SANTOS, F.R.; SCHNEIDER, M.P.C.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, A.M.R.; DA SILVA, A.L.D.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SIMÕES, I.D.; SIMON, D.; SOARES, C.M.D.; SOARES, R.D.A.; SOUZA, E.M.; DE SOUZA, K.R.L.; SOUZA, R.C.; STEFFENS, M.B.R.; STEINDEL, M.; TEIXEIRA, S.R.; URMENYI, T.; VETTORE, A.; WASSEM, R.; ZAHA, A.; SIMPSON, A.J.G. (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **100(20)**: 11660-11665.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA J.T. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon.**, **44(4)**: 385-403.

VAZQUEZ-ARISTA, M.; SMITH, R.H.; OLALDE-PORTUGAL, V.; HINOJOSA, R.E.; HERNANDEZ-DELGADILLO, R.; BLANCO-LABRA, A. (1997). Cellulytic bacteria in the digestive system of *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostricidae). **J. Eco. Entomol.**, **90**: 1371-1376.

VODOVAR, N.; VALLENET, D.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; BARBE, V.; ACOSTA, C.; CATTOLICO, L.; JUBIN, C.; LAJUS, A.; SEGURENS, B.; VACHERIE, B.; WINCKER, P.; WEISSENBAACH, J.; LEMAITRE, B.; MEDIGUE, C.; BOCCARD, F. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. **Nat. Biotechnol.**, **24(6)**: 673-9.

VOLNER, A.; SAM, M.; HAN, A.Y. (2000). *Chromobacterium violaceum* phenylalanine hydroxylase: Cloning, purification, and iron-dependent catalysis. **Abstr. Papers Am. Chem. Soc.**, **219**: U848-U848.

WANG, Y. D.; ZHAO, S.; HILL, C. H. (1998). *Rhs* elements comprise three subfamilies which diverged prior to acquisition by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **180**: 4102-4110.

WEITZMAN, S.; SCOTT, V.; KEEGSTRA, K. (1979). Analysis of glycopeptides as borate complexes by polyacrylamide gel electrophoresis. **Anal. Biochem.**, **97**: 438-449.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.A.P.; ARY, M.B.; SILVA, C.P.; CARVALHO, M.M.M.; MACEDO, M.I.R.; LEMOS, F.J.A.; GRANT, G. (1989). Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in some seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **37**: 1139-1143.

XAVIER-FILHO, J.; SALES, M.P.; GERHARDT, I.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, **124**: 515-522.

YUNES, A.N.A.; ANDRADE, M.T.; SALES, M.P.; MORAIS, R.A.; FERNANDES, K.V.S.; GOMES, V.M.; XAVIER-FILHO, J. (1998). Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.)). **J. Sci. Food Agric.**, **76**: 111-116.

ZHAO, J.Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H.L.; ROUSH, R.T.; EARLE, E.D.; SHELTON, A.M. (2003). Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nat. Biotechnol.**, **21(12)**: 1493-1497.

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

ZIMMERMAN. (1880). Review of Bergonzini on *Cromobacterium*. **Bot. Centralbl.** **4**, 1528. Citado por BUCHANAN, R.E. (1917). Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. V. subgroups and genera of the bacteriaceae. **The Journal of Bacteriology**, **3(1)**: 52.

ZINGER-YOSOVICH, K.; SUDAKEVITZ, D.; IMBERTY, A.; GARBER, N.C.; GILBOA-GARBER, N. (2006). Production and properties of the native *Chromobacterium violaceum* fucose-binding lectin (CV-IIL) compared to homologous lectins of *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IIL) and *Ralstonia solanacearum* (RS-IIL). **Microbiology**, **152**: 457-463.