

MAIANA REIS PIMENTA

**ESTUDO MOLECULAR EM *Ricinus communis* L. VISANDO A
DIVERGÊNCIA GENÉTICA, A INIBIÇÃO CAUSADA PELO EXTRATO
PROTEICO SOBRE TRIPSINA DE *Erinnyis ello* L. E A PROSPECÇÃO
DE GENES DO TIPO INIBIDOR DE TRIPSINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Pimenta, Maiana Reis

Estudo molecular em *Ricinus communis* L., visando a divergência genética, a inibição causada pelo extrato protéico sobre tripsina de *Erinnyis ello* L. e a prospecção de genes do tipo inibidor de tripsina / Maiana Reis Pimenta. --
Lavras : UFLA, 2006.

72 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Mamona. 2. Divergência genética. 3. Inibidor de tripsina. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.950415

MAIANA REIS PIMENTA

**ESTUDO MOLECULAR EM *Ricinus communis* L. VISANDO A
DIVERGÊNCIA GENÉTICA, A INIBIÇÃO CAUSADA PELO EXTRATO
PROTEICO SOBRE TRIPSINA DE *Erinnyis ello* L. E A PROSPECÇÃO
DE GENES DO TIPO INIBIDOR DE TRIPSINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 24 de março de 2006.

Prof. Luciano Vilela Paiva DQI/UFLA

Antônio Chalfun Júnior DBI/UFLA

Magnólia de Araújo Campos DBI/UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

*Aos meus pais, Marcos e Glória,
aos meus irmãos Maíra e Uirá,
ao meu namorado Gutenberg
e aos meus familiares queridos.*
OFEREÇO

*DEDICO esta dissertação aos amigos.
Aos que se tornaram familiares,
Aos que nasceram familiares
E aos que conheci antes de ontem.
Dedico tanto aos que me deixam louco,
Quanto aos que enlouqueço.
Aos que me criticam em tudo,
E a um ou outro que atura minha “chatura”.
Aos amigos que correm,
Aos que contemplam.
Aos que me consideram muito,
E aos que, com razão, fazem pouco.
Aos que conhecem o que penso,
E aos que só conhecem o que faço.
Aos que passam o dia todo comigo,
E aos que estão todo o tempo dentro de mim.
Esta dissertação é a soma de todos vocês.
E se ela não é melhor,
Não é por falta de amigos!
(Autor desconhecido)*

*"E as dúbias sombras tomavam forma, (...)
e as linhas desenhavam-se nítidas,
e tudo ia se esclarecendo e tudo se aclarava..."
(Aluísio de Azevedo)*

AGRADECIMENTOS

Ao final destes dois anos, posso dizer que foi tudo aprendido, tanto profissional como pessoal e tive a ajuda de algumas dezenas de pessoas, as quais faço questão de agradecer agora.

Algumas deram ajuda profissional, outras ajudaram com a simples presença, olhares, cervejas e risos ou ainda, com todas essas coisas e tornaram tudo mais fácil.

Quero agradecer também a aquelas mais especiais, que sempre estiveram comigo, muitas vezes longe, mas que estiveram sempre torcendo por mim e que eu amo muito.

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida,

Ao meu pai Marcos e minha mãe Glória, por serem minha base, minha razão, meu sossego, meu tudo....

À Maíra e ao Uirá, meus irmãos, meus amigos, meus amores;

Ao Luiz Henrique, meu cunhadinho querido;

Ao meu mais que namorado e menos que marido, ao Gutenberg, por toda a ajuda possível, pelas conversas, conselhos, convivência, tolerância, paciência, amizade e amor.

Ao Paul, Daniel (Guela) e à Deborah (cucu), pela convivência, aprendizado, amizade e apoio;

Aos amigos da Fisiologia "Guto", "Espeto", Samantha, Fernanda Soares e Fernandinha Grisi, "Fran", Girlene, Anderson, "Leninha", Izonel, "Tanham", Evaristinho, Alessandro, Patrícia e Fernanda Neri pelo convívio e amizade;

Aos amigos do LCBM Anderson, Nilson, Joyce, Sanzio, Paula Torga, "Zé", Guilherme e ao Geraldo e Marcela, pela colaboração e amizade. Agradeço também ao Guilherme que esforçado, competente e humilde chegou ao LCBM, infelizmente já na "reta final" desta dissertação, mas se tornou muito querido e

especial, sempre disponível, interessado e disposto a ajudar no que fosse preciso. Muito obrigada por tudo!!!.

Agradeço também a aqueles amigos que se enquadram nos dois últimos grupos: Rodrigo Kelson, Marcus, Paula Cabral, Janaína, Gracielle e Rosângela (Rose), que sempre estiveram dispostos a ajudar em tudo que fosse preciso, sempre com muita boa vontade e disposição. Muito obrigada a vocês!

Ao pessoal da Bioinfo, Raphael, Rodrigo, Monalisa, Bruno, Carolina e Ana Carolina, Luca e Lucas.

Ao Guilherme (Popeye), Irene e a Xulita, do Laboratório de Bioquímica por tudo!

Ao Luciano, meu orientador, pelos ensinamentos e pela prontidão durante estes dois anos;

À Magnólia pelos ensinamentos, dedicação, disponibilidade e amizade durante todo o curso e pela confiança a mim depositada;

Ao Chalfun pela disponibilidade e valiosas e constantes contribuições apresentadas para o êxito deste trabalho;

Ao Custódio pela co-orientação e paciência;

À professora Dulcinéia e à Evânia, da Engenharia Florestal e à Rose pela prontidão e auxílio na análise estatística dos dados moleculares.

Aos professores do Setor de Agroclimatologia, Pedro e Fraga por todo o material vegetal utilizado neste estudo e aos seus estagiários pelas valiosas ajudas nas coletas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade;

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, em especial ao Professor Luiz Edson Mota pelos ensinamentos transmitidos;

À CAPES pela concessão da bolsa.

Muito obrigada a todos vocês!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
ESTUDO MOLECULAR EM <i>Ricinus communis</i> L. VISANDO A DIVERGÊNCIA GENÉTICA, A INIBIÇÃO CAUSADA PELO EXTRATO PROTEICO SOBRE TRIPSINA DE <i>Erinnyis ello</i> L. E A PROSPECÇÃO DE GENES DO TIPO INIBIDOR DE TRIPSINA.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1 Marcadores moleculares RAPD e divergência genética	7
2.2 <i>Erinnyis ello</i>	10
2.3 Inibidores de Proteases.....	15
2.3.1 Inibidores de proteinases serínicas.....	16
CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE VARIEDADES DE <i>Ricinus communis</i> L. POR MEIO DE MARCADORES RAPD	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	31
2.2 Amplificação via RAPD.....	33
2.3 Análise estatística dos dados moleculares.....	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4 CONCLUSÕES.....	43
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO 3- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES DE <i>Erinnyis ello</i> L. NA PRESENÇA DE INIBIDORES EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE MAMONA	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48

1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Extração do inibidor de tripsina de folhas de mamona	52
2.2 Extração de tripsina de <i>Erinnyis ello</i>	52
2.2.1 <i>Erinnyis ello</i>	52
2.2.2 Obtenção da enzima digestiva.....	53
2.3 Ensaio da atividade inibitória de tripsina	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1 Ensaio da atividade inibitória de tripsina	54
4 CONCLUSÕES.....	57
5 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	58
CAPÍTULO 4 PROSPECÇÃO DE GENES DO TIPO INIBIDOR DE TRIPSINA DE <i>Ricinus communis</i> L.....	59
RESUMO	60
ABSTRACT	61
1 INTRODUÇÃO.....	62
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 Desenho de primers	64
2.2 Condições térmicas de reações em cadeia de polimerase (PCR).....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 Análise estrutural de genes inibidores de tripsina e desenho de primers.....	65
3.2 Amplificação via PCR.....	69
4 CONCLUSÃO.....	71
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Famílias propostas e reconhecidas para <i>Pathogenesis-related protein</i>	04
Tabela 02	Grupos de inibidores de proteases	15
Tabela 03	Plantas transformadas com genes que codificam para inibidores de proteases contra predadores.....	18
Tabela 04	Possíveis resultados de comparações de dois genótipos por marcadores RAPD. (a) Presença de banda em ambos os genótipos. (b) bandas exclusivas do genótipo j, (c) bandas exclusivas do genótipo i e (d) ausência de bandas em ambos os genótipos.....	34
Tabela 05	Bandas polimórficas obtidas pelos primers RAPD.....	36
Tabela 06	Matriz de similaridade genética entre as 21 variedades de <i>Ricinus communis</i> obtida pelo índice de Jaccard. A menor distância (0,2) foi obtida entre as variedades 1 e 18 e as maiores (0,75) entre as variedades 3 e 5 e as variedades 12 e 21.....	38
Tabela 07	Agrupamento de indivíduos de <i>Ricinus communis</i> L. Com base no polimorfismo de bandas obtidas por RAPD e na análise da distância genética por UPGMA.....	41
Tabela 08	Unidades de tripsina presentes no tubo digestivo (Ensaio) e unidades de tripsina inibidas nos extratos de mamona não fervido (Inibição) e fervido.....	55
Tabela 09	Identificação das seqüências utilizadas no alinhamento para desenho dos primers.....	66
Tabela 10	Seqüências dos primers desenhados com as caudas das enzimas de restrição utilizadas.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	(a) Disposição dos ovos de <i>Erinnyis ello</i> sob folha de mandioca (b) Larva no quinto e último estágio larval (c) Pupa.....	11
Figura 02	Padrão de similaridade genética obtida entre 21 variedades de mamona, definido pelo critério de agrupamento UPGMA com base na média de Jaccard.....	40
Figura 03	Dendograma obtido pelo método do UPGMA apresentando os seis distintos grupos formados e o ponto de corte ao nível de 1% de probabilidade obtido pelo teste de <i>t</i>	42
Figura 04	a) Inibidor de tripsina tipo Kunitz e b) Bowman-Birk. Em amarelo sítios de ligação com as proteases específicas (1 para Kunitz e 2 para Bowman-Birk); em vermelho pontes dissulfeto (mais numerosas em Bowman-Birk que em Kunitz).....	50
Figura 05	Criação e dessecação de larvas de <i>Erinnyis ello</i> L.; 1- Ovos de <i>Erinnyis ello</i> coletados em campo de cultura de mandioca; 2- Lagarta no primeiro ínstar (a caneta foi colocada para efeito de comparação); 3- Larva já no quinto e último ínstar (12 dias); 4- Larva no último ínstar em banho de gelo; 5- início da dessecação larvar; 6- conteúdo do intestino ainda envolto pelo mesmo; 7- retirada do intestino e 8- intestino e conteúdo separados em tubos de ensaio.....	53
Figura 06	Alinhamento das seqüências protéicas de inibidores de tripsina do tipo Kunitz. A região marcada em cinza representa a seqüência do peptídeo sinal predita pelo programa signal-P.....	67
Figura 07	Alinhamento das seqüências protéicas de inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk. A região marcada em cinza representa a seqüência do peptídeo sinal predita pelo programa signal-P.....	67
Figura 08	(a) Esquema do gene inibidor de tripsina do tipo Kunitz (b) Esquema do gene inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk As setas representam os locais de anelamento dos primers desenhados. PS= Peptídeo sinal; KTI= Kunitz tripsin inhibitor; BBI= Bowman-Birk inhibitor.....	69
Figura 09	Gel de agarose 1% mostrando resultado da aplicação de PRC utilizando primers específicos para genes inibidores de tripsina do tipo Kunitz KTI e Bowman-Birk BBI. M= marcador 1Kb ladder. Canaletas 1 e 2 - Primers KTI 1 e KTI 3; canaletas 3 e 4 primers KTI 2 e KTI 3; canaletas 1' e 2' BBI 1 e BBI 3 canaletas 2' e 4' BBI 2 e BBI 3.....	70

**ESTUDO MOLECULAR EM *Ricinus communis* L. VISANDO A
DIVERGÊNCIA GENÉTICA, A INIBIÇÃO CAUSADA PELO EXTRATO
PROTEICO SOBRE TRIPSINA DE *Erinnyis ello* L. E A PROSPECÇÃO
DE GENES DO TIPO INIBIDOR DE TRIPSINA**

RESUMO

PIMENTA, Maiana Reis. **Estudo molecular em *Ricinus communis* L., visando a divergência genética, a inibição causada pelo extrato proteico sobre tripsina de *Erinnyis ello* L. e a prospecção de genes do tipo inibidor de tripsina** 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A mamona (*Ricinus communis* L.) pertence à família Euphorbiaceae, que engloba vasto número de tipos de plantas nativas da região tropical. É considerada politípica e dividida em seis subespécies e 25 variedades botânicas, que têm áreas de ocorrência individuais ou sobrepostas, diferindo não só morfologicamente, mas também, genética e ecologicamente. *Erinnyis ello* é um lepdóptero, que no estágio larval ataca diversas espécies de plantas da família Euphorbiaceae, dentre elas a mandioca. Quando comparada com a taxa de desenvolvimento daquelas alimentadas com folhas de mandioca, as larvas alimentadas com folhas de mamona apresentaram um decréscimo no crescimento. Tal redução é causada pela presença de inibidores de proteinases nas folhas de mamona. No presente estudo, a diversidade genética de 21 variedades de *Ricinus cummunis* foi analisada por meio de marcadores RAPD. Através de uma matriz de presença (1) e ausência (0) gerada através de fragmentos de DNA amplificados, foi gerada a matriz de similaridade genética e desta, o dendograma das variedades, através do qual podem-se separar 6 grupos distintos. O valor mínimo de similaridade ao nível de 1 % de probabilidade, determinado pelo teste de *t* foi de 0,98, confirmando a diversidade genética entre as referidas cultivares. Para caracterizar inibidores de proteinases em folhas de mamona, procedeu-se testes enzimáticos nos quais, o extrato proteico de 23 variedades de mamona foi utilizado como fonte de inibidor de tripsina, o tubo digestivo da larva de *E. ello* no quinto estágio larval como fonte de tripsina e BAPNA como substrato. A inibição também foi testada com o extrato de mamona fervido. Os resultados indicam a presença de inibidores em todas as variedades de mamona, mesmo quando o extrato com o inibidor foi fervido por cinco minutos. Objetivando o isolamento de genes que codificam para inibidores de proteases em mamona, sequências específicas para os inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk disponíveis no banco de dados NCBI, foram utilizados para a confecção de primers. Os primers desenhados foram utilizados para a amplificação via PCR e as bandas de tamanho esperado foram visualizadas em gel de agarose 1 %.

Comitê orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (orientador), Antônio Chalfun Júnior (UFLA), Custódio Donizete Santos (UFLA), Magnólia de Araújo Campos (UFLA)

ABSTRACT

PIMENTA, Maiana Reis. **Molecular Study in *Ricinus communis* L. aiming the genetic divergence, the inhibition caused by proteic extract from trypsin of *Erinnys ello* L. and the gene prospection of trypsin inhibitor type** Lavras UFLA 2006. 72p. Dissertation (Master in Plant Physiology).

The mung bean (*Ricinus communis* L.) belongs to Euphorbiaceae family, that has a large number of native plants from tropical regions. It is considered a multitypical and divided in six subspecies and 25 botanical varieties that have occurrence areas individual or sobreposed, differing not only morphologically, but also the genetical and ecological aspects. In this study, the genetic diversity by RAPD markers. Based in the matrix presence (1) and absence (2) obtained from amplified DNA fragments, it was made a similarity genetic matrix, and from this one, the varieties dendogram, were it is possible to separate 6 distinct groups. The minimum value of similarity at 1% of probability level, determined by test *t* was 0,98, confirming the genetic diversity among the refered cultivars. *Erinnys ello* is a lepdoptepterum that in larval stage attack diverse plant species of Euphorbiaceae family, and among them manihot. When compared with a development rate from that ones fed with manihot leaves, the larvs feed with manihot leaves showed a decrease in growth. This reduction is caused by inhibitors presence of proteinases in mung bean leaves. In order to characterize the proteinases inhibitor in mung bean leaves, enzymatic tests were done, the proteic extracts of 23 mung bean varieties were used as trypsin inhibitor source, the digestive tube of *E. ello* larvae in the fifth larval stage as tripsin source and BAPNA as substrate. The inhibition was also tested with the Castor bean boiled. The results indicate the presence of inhibitors in all varieties of castor bean, when the extract with the inhibitor was boiled during five minutes. Aiming to isolate the genes that codify for proteases inhibitors in castor bean, specific sequences for tripsin inhibitors like Kunitz and Bowman Birk type available in the NCBI data bank, were used to design primers. The primers obtained were used for amplification via PCR and the band size were visualized in agarose gel 1%

[^] Guidance committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Major professor), Antônio Chalfun Júnior (UFLA), Custódio Donizete Santos (UFLA), Magnólia de Araújo Campos (UFLA)

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L.) pertence à família Euphorbiaceae, é uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e racemos (cachos), podendo ou não possuir cera no caule e pecíolo. Os frutos, em geral, possuem espinhos e, em alguns casos, são inermes. As sementes apresentam-se com diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração.

A definição sobre a origem da mamona é dificultada devido a sua larga dispersão e fácil adaptação pelo mundo, pois vegeta bem nas regiões tropicais e subtropicais e, até mesmo, em países de clima temperado, sendo muito variável no hábito e na aparência (Grievé, 1999). Sementes desta espécie foram encontradas em urnas funerárias de múmias notáveis, principalmente de sacerdotes egípcios. A origem desses fatos, que retroage há mais de 4000 anos, é prova da antiguidade da planta e indica a veneração desses povos por ela, provavelmente, atribuindo-lhe propriedades medicinais (Alonso, 1998; Fontquer, 1979; Gupta, 1995; Peres, 1997; Rodrigues, 2002).

A família Euphorbiaceae contém cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7500 espécies (Joly, 1979). Na classificação botânica mais recente, a espécie *Ricinus communis* é considerada politípica e dividida em seis subespécies e 25 variedades botânicas que têm áreas de ocorrência individuais ou sobrepostas, diferindo não só morfológicamente, mas também genética e ecologicamente (Popova & Moshkin, 1986).

Até 2002 a Índia, China e Brasil eram os três principais países produtores, em área e produção, de mamona em baga, tendo em 2001 sido responsáveis por 89% da área e 94% da produção mundial. Hoje os maiores produtores são a Índia, a China, o Paquistão, a Tailândia e o Brasil com o 5º lugar. A Alemanha e Tailândia são os principais países importadores, tendo sido

responsáveis em 2000 por 91% das importações mundiais de mamona em baga (Santos, 2003).

No Brasil, segundo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 2005, o estado da Bahia foi o principal produtor de mamona seguido pelos estados de São Paulo, Minas Gerais, Piauí e Ceará. Devido ao grande interesse na produção de óleo da mamona como biodiesel, uma vez que sua semente contém 47% de óleo, na maioria dos estados brasileiros, principalmente das regiões do Nordeste, Centro-Oeste e Norte, está sendo incentivado o plantio da mamona. A produtividade varia de 1.500 a 4.000 quilos de sementes por hectare. Essa diferença na produtividade está na dependência de variedades, fertilidade do solo, disponibilidade de água no solo, condições climáticas e ocorrência ou não de doenças nas plantas.

A maioria dos trabalhos com *Ricinus communis* L. foram feitos utilizando-se suas sementes. O óleo delas extraído é estudado sob múltiplos enfoques e inúmeras aplicações, sendo assim viabilizadas. A fração proteica das sementes foi, sem dúvida, a parte que maior atenção despertou dos pesquisadores, sendo por isso mais estudada (Alonso, 1998; Gupta, 1995; Rodrigues, 2002).

As folhas costumam ser empregadas como antimicrobianas, acaricidas, filaricidas, moluscicidas ou antivirais. No Brasil, são utilizadas popularmente como hipoglicemiante e como diurético e atualmente vêm chamando atenção de pesquisadores preocupados com o teor de seus componentes.

As plantas, em geral, possuem um variado grau de resistência a insetos, desenvolvida a partir dos vários mecanismos de defesa utilizados por elas durante a evolução (Schuler et al., 1998).

Há muitos anos vem se estudando a biossíntese e a regulação de compostos químicos de plantas, associados com essas defesas. São encontrados nos diferentes tecidos vegetais, na forma de componentes constitutivos fazendo parte do desenvolvimento da planta ou não, podendo também ser sintetizados em

resposta ao ataque de pragas e patógenos. Entre eles são incluídas as proteínas de defesa (Ryan, 1991), que são sintetizadas pela planta hospedeira em situações patológicas. São variadas, podem apresentar diferentes tipos de ação e recebem o nome de “*Pathogenesis-related protein*” ou proteínas PR.

PRs são distinguidas por propriedades bioquímicas específicas. Têm baixo peso molecular (6-43 KDa), estáveis a pHs baixos (<3), termoestáveis e alta resistência a proteases (Van Loon, 1999). A princípio foram divididas em cinco grupos, de acordo com a ordem crescente de mobilidade eletroforética (Bol et al., 1990) e em 1994 a nomenclatura de PRs foi unificada. A classificação passou a ser feita em famílias de acordo com semelhanças na seqüência de aminoácidos, relações serológicas e atividade enzimática ou biológica. Onze famílias foram reconhecidas e classificadas para tabaco e tomate, sendo as famílias PR-8 e PR-10 presentes em pepino e parsley, respectivamente (Van Loon, 1994).

Mais tarde, três novas famílias foram identificadas (PR-12, PR-13, PR-14) em rabanete, *Arabidopsis* e cevada (Van Loon & Van Strien, 1999) (Tabela 01).

Os Inibidores de proteases (IPs) são proteínas pertencentes à sexta família de proteínas relacionadas à patogênese (PR-6) que possuem massa molecular variável entre 10 e 90 kDa (Richardson, 1991). São denominados de acordo com a protease inibida e/ou sua fonte como, por exemplo, o inibidor de tripsina de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Kunitz, 1947).

Tabela 01: Famílias propostas e reconhecidas para *Pathogenesis-related protein* (Van Loon, Van Strien, 1999)

Familia	Membro típico	Propriedade
PR-1	Tobacco PR-1 a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	b-1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco "R"	chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like
PR-6	Tobacco Inhibitor I	proteinase inhibitor
PR-7	Tobacco P 6 g	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III
PR-9	Tobacco "lignin-foming peroxidase"	Peroxidase
PR-10	Parsley "PR1"	"ribonuclease-like"
PR-11	Tobacco class V chitinase	chitinase type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein

Os inibidores de proteases constituem-se em mais um elemento dentre os vários mecanismos vegetais de defesa contra microrganismos fitopatogênicos e, embora a maioria das pesquisas já publicadas para esses inibidores concentre-se na defesa de plantas contra insetos herbívoros, há também um interesse recente da Fitopatologia no assunto. O papel dos inibidores de proteases nas interações planta-microrganismo ainda não é claro, mas considera-se que atuem na defesa das plantas principalmente por retardar a proteólise de paredes celulares e de proteínas da membrana, reduzindo a desorganização celular e dificultando a atuação de patógenos (Richardson, 1991; Sikes & Maxcy, 1979).

Os inibidores de proteases mais conhecidos e estudados são aqueles que afetam a atividade de serino-proteases, cisteíno-proteases, proteases aspárticas e metaloproteases, que são os quatro grandes grupos aos quais pertencem as enzimas proteolíticas (Laskowski & Kato, 1980). Os inibidores de tripsina, uma serino-protease, concentram o maior número de pesquisas no assunto, sendo as

famílias Solanaceae, Leguminosae e Gramineae as mais investigadas quanto à atividade de inibidores (Deshimaru, 2004; Richardson, 1991).

A lagarta de *Erinnyis ello* L. é um defoliador de mandioca (Belloti & Van Schoonhoven, 1978), que em grandes populações, pode desfolhar plantações rapidamente e alimentar-se de tecido de talo e brotos laterais, após o consumo do tecido foliar.

Foi observada uma baixa taxa de crescimento de lagartas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera - Sphingidae) alimentadas com folhas de mamona, quando comparadas àquelas alimentadas com mandioca (dados não publicados), ambas pertencentes à família Euphorbiaceae, da qual se alimenta a praga.

Tal fato pode ser atribuído à presença de um inibidor nas folhas de mamona, que impede a ação da protease tripsina, e estando a tripsina inibida, a velocidade de hidrólise das proteínas é menor e conseqüentemente a velocidade de crescimento das lagartas.

A transferência de genes pode ser considerada um passo crucial no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos. Nesse sentido, os inibidores de protease apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, causando-lhes desnutrição e redução do desenvolvimento larval. Dependendo dos níveis de expressão, os inibidores podem causar a morte das larvas dos insetos. A proteção eficiente contra insetos em plantas transformadas demanda que os inibidores sejam acumulados em células vegetais em um nível maior do que em plantas não transformadas (Augustyniak et al., 1997). Em 1987, Hilder e colaboradores obtiveram a primeira planta transgênica que expressava um gene de inibidor de protease. Eles construíram plantas de tabaco contendo o gene que codifica para o inibidor de protease serínica de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Essas plantas que são susceptíveis ao inseto *Heliothis virescens* adquiriram altos níveis de resistência ao mesmo e, em estudos subsequentes, plantas resistentes foram obtidas contra os insetos *Lacanobia oleracea* e *Otiornychus sulcatu* (Gatehouse

& Gatehouse, 1999). Desde então, muitas outras plantas de interesse comercial foram transformadas com genes de inibidores de proteinases.

A prospecção do gene de interesse pode ser facilmente realizada com o auxílio de técnicas em Biologia Molecular, que vem sendo imprescindível aos estudos genéticos e moleculares. A Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction- PCR*) é uma técnica utilizada para a amplificação de ácidos nucleicos específicos. Para tanto, são utilizados oligonucleotídeos sintéticos denominados *primers*, os quais são complementares a duas regiões específicas do DNA, alvo a ser amplificado. Durante o desenho de *primers* para PCR, é necessário respeitar algumas regras de tamanho, composição e temperatura de anelamento, uma vez que este desenho é passo chave para uma reação e conseqüente amplificação bem sucedida.

Como a mamona é uma espécie alógama, politípica e de fácil adaptação e dispersão, é importante conhecer exatamente a variedade utilizada para a prospecção do gene de interesse. Marcadores moleculares são ferramentas úteis para se realizar o estudo da divergência genética e portanto realizar a diferenciação entre as variedades estudadas.

Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram:

- analisar a divergência genética entre 21 diferentes variedades de mamona por meio de marcadores RAPD;
- testar a porcentagem de inibição de tripsina de *E. ello* apresentada por cada cultivar;
- desenhar *primers* específicos para inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk através de seqüências obtidas em banco de dados;
- realizar a prospecção do gene inibidor de tripsina de *R. communis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Marcadores moleculares RAPD e divergência genética

A utilização de marcadores moleculares na análise genética e no melhoramento de plantas aumentou exponencialmente desde a concepção da tecnologia da reação em cadeia da polimerase, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida por Kary Mullis (Mullis & Faloona, 1987).

A PCR fundamenta-se no anelamento e na extensão enzimática de um par de *primers* utilizados como iniciadores, que delimitam a seqüência de DNA da fita dupla alvo da amplificação. Esses iniciadores são sintetizados de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O principal avanço trazido pela técnica PCR foi a possibilidade de sintetizar, *in vitro*, milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase.

Entre os vários tipos de marcadores moleculares disponíveis, destacam-se os de maior utilização, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeat*) (Willians et al., 1990).

A técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (Welsh & McClelland, 1990; Willians et al., 1990) é uma variação do protocolo de PCR, que utiliza apenas um único *primer* com 10 nucleotídeos de comprimento e de seqüência arbitrária, que se anela em regiões do genoma e sintetiza múltiplos produtos de amplificação, detectando polimorfismo na ausência de informação específica da seqüência de nucleotídeos do DNA molde (Willians et al., 1990).

O primeiro passo para a utilização desta técnica refere-se à escolha dos *primers* a serem utilizados, que deve basear-se na seguinte ordem: revelar

diferenças, produzir bandas bem definidas e favorecer um padrão reproduzível (Loxdale et al., 1996).

O polimorfismo é evidenciado quando há presença ou ausência de bandas após a amplificação e eletroforese em gel. Normalmente, o padrão de herança de bandas produzidas por esta técnica é dominante. No caso de indivíduos heterozigotos, a banda também será observada, impossibilitando a distinção de um dos homozigotos do heterozigoto (Carlson et al., 1991; Willians, et al., 1990).

Para o estudo da divergência genética, é necessário o estabelecimento de uma medida (coeficiente) de similaridade entre dois indivíduos, sendo este o ponto de partida para várias técnicas de análise multivariada, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os mesmos (Krzanowski, 1998).

Os métodos de agrupamento utilizam a dissimilaridade ou distância entre indivíduos ou populações para a formação dos grupos (Wier et al., 1990). Existem diversos coeficientes de similaridade, os mais simples relacionam-se com variáveis dicotômicas, nas quais cada variável tem apenas dois valores. Marcadores do tipo RAPD são binários e incluídos neste tipo de variável. As quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas na presença (1) e ausência (0), como diversos coeficientes têm sido propostos, a escolha do mais apropriado está diretamente relacionada com as suas propriedades. Aspectos como a natureza dos dados e o tipo de análise a ser implementada são igualmente fundamentais para auxiliar na escolha. Assim, alguns dados quantitativos podem ser melhor investigados quando convertidos em dados binários, de modo a reunir todos os valores abaixo e acima de um nível de interesse. O método de análise também pode limitar a escolha do coeficiente (Alfenas, 1998).

Quando se trata de métodos de agrupamento, a literatura, da mesma forma que os tipos de coeficientes, também revela uma enorme diversidade de métodos. Segundo Cruz & Regazzi (1994), os métodos de agrupamento mais

utilizados têm sido o método do vizinho mais próximo, o método do vizinho mais distante e o método das médias das distâncias.

O princípio geral de todos os métodos de agrupamento tem sido o de maximizar a similaridade dentro dos grupos e a dissimilaridade entre eles.

Também conhecido como método da ligação simples ou *single linkage*, o método do vizinho mais próximo inicia-se pela identificação dos dois itens com menor distância relativa entre si, processada na matriz de distância $n \times n$. Esse par de itens é fundido e gera o primeiro grupo. A seguir, são calculadas as distâncias dos $n-2$ itens restantes, com relação a cada um dos dois itens do primeiro grupo, sendo identificada a menor dessas distâncias para a matriz de distância reduzida $(n-1) \times (n-1)$. A redução da dimensão da matriz ocorre em virtude de o primeiro grupo formado ser inserido nela como um único item. Nessa seqüência, o item identificado como o mais próximo do primeiro grupo é fundido a ele para formar um grupo de três itens. O processo se repete até a formação de um único agrupamento.

O método do vizinho mais distante é a antítese do vizinho mais próximo, pois opera com o par mais distante de itens.

No método das médias das distâncias, o critério utilizado para a formação dos grupos é a média das distâncias entre os pares de itens que formam cada grupo, como a própria denominação informa. É conhecido como método da média aritmética entre pares não ponderados UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), desenvolvido por Sokal & Michener (1958).

O que há de comum entre todos os três métodos de agrupamento descritos é que eles operam sobre a matriz de distância, dispensando o retorno à matriz de dados originais (Dias, 1998).

O processamento de análises multidimensionais pode ser realizado por meio de *softwares* como, por exemplo, o programa NTSYS – PC 2.0 desenvolvido por Rohlf (1992).

2.2 *Erinniys ello*

Na cultura da mandioca bem como em várias outras culturas, à medida que aumenta o nível tecnológico e sua extensão territorial, tem-se normalmente um aumento de problemas entomológicos. Nas Américas, existe uma estimativa de 200 espécies de artrópodes que se alimentam na cultura da mandioca (Schmitt, 2001).

Os insetos pragas parecem não causar danos significativos em regiões onde a precipitação é regular, entretanto, as principais regiões de plantio estão concentradas em regiões com condições climáticas irregulares e precipitações pluviométricas limitadas. Nas estações secas ou com períodos prolongados de seca, o aumento de estresse na planta, ocasionado também pela incidência de insetos pragas, pode causar sérios danos. Alguns insetos pragas, como o mandrová da mandioca, *Erinniys ello*, podem causar prejuízos em determinadas condições. O uso de produtos químicos de maneira abusiva e inadequada, muitas vezes, ao invés de controlar eficientemente uma determinada praga, pode causar problemas maiores para a agricultura, como a contaminação ambiental, o aumento de resíduos nos produtos e a eliminação de inimigos naturais.

A lagarta de *E. ello* é considerada um dos mais importantes problemas para esta cultura, pode ocorrer durante todo o ano, variando, entretanto, na intensidade de ataque. Trata-se de um inseto polífago observado em 35 espécies de plantas, especialmente da família Euphorbiaceae. O indivíduo adulto é uma mariposa de hábitos noturnos, com asas anteriores de cor cinza e as posteriores com coloração ferrugem. Possuem acentuado dimorfismo sexual, os machos são menores que as fêmeas, têm coloração mais escura e as asas anteriores apresentam uma faixa longitudinal de cor escura. As fêmeas podem viver até 19 dias e os machos no máximo 15 dias. A cópula normalmente ocorre durante a noite, nas primeiras 24 horas depois da emergência dos adultos. A ovoposição

tem início dois ou três dias após a cópula. Os ovos, arredondados, de coloração verde ou amarela, são colocados individualmente sobre a face superior da folha podendo, no entanto, serem depositados na face inferior, pecíolo e talos quando em grandes infestações (Figura 01).



Figura 01: (a) Disposição dos ovos de *Erinnyis ello* sob folha de mandioca (b) Larva no quinto e último estágio larval (c) Pupa.

As lagartas eclodem de 3 a 5 dias após a ovoposição, apresentando uma marcante variação de cores, sendo as mais comuns: amarela, verde, negro e cinza escuro (Figura 01 b), o que pode estar relacionado com o número de lagartas na planta, condições climáticas e outros fatores desconhecidos.

A lagarta passa por cinco instares, podendo atingir de 10 a 12 cm de comprimento, que podem ser determinados através do cornículo caudal, apêndice filamentosos e delgado encontrado no último segmento abdominal. O estágio de desenvolvimento larval é utilizado para se programar o método de controle a ser utilizado. Depois de completados os cinco instares, a lagarta desce ao solo e se esconde por aproximadamente dois dias, passando por um estágio de pré-pupa sob folhas caídas (Figura 01 c).

Os danos causados pelas lagartas são responsáveis diretos pela perda de produção e tais perdas estão relacionadas com a população de lagartas, idade e vigor das plantas, número e intensidade do ataque, sendo que 94 % dos danos ocorrem nos dois últimos instares (Barrigrossi, 2002).

Existem atualmente alguns métodos de controle desta praga, como as armadilhas luminosas, que embora não constituam um método de controle propriamente dito, permitem fazer o monitoramento populacional de adultos.

Vale salientar que o número de lagartas e ovos está associado à população de adultos. Outros métodos de controle incluem as práticas culturais, que consistem no controle de plantas daninhas e boa preparação do solo, o que pode reduzir a população de adultos e pupas. Além dessas, pode-se fazer uso também do controle biológico, que se baseia na utilização de inimigos naturais da praga juntamente com o manejo da cultura.

O controle de insetos por pesticidas em qualquer espécie tem a grande desvantagem desses químicos serem altamente tóxicos para o homem e para o meio ambiente. Outra desvantagem do seu uso, especificamente em árvores, consiste na dificuldade de aplicação em razão da altura dos indivíduos e à grande área de cultivo, o que aumenta significativamente a quantidade de pesticida aplicado e, conseqüentemente, a poluição do meio ambiente e o custo da produção.

A primeira estratégia para evitar as perdas por ataques de insetos é procurando espécies ou cultivares de interesse com resistência natural ao inseto, como foi reportado recentemente o estudo para avaliar 80 clones de *Populus deltoides*, florestal de importância na Índia, em relação à susceptibilidade ou resistência ao lepidóptero *Clostera cupreata*, considerado praga nesse país (Singh, 2000). Esse método, porém, é laborioso e demanda muito tempo. A transformação genética, por outro lado, embora também seja uma técnica laboriosa, permite a obtenção de plantas resistentes a insetos independentemente da existência de clones resistentes. Naturalmente, pode e deve ser aplicada em paralelo à estratégia de procura de clones resistentes.

Outro fator de resistência ao ataque de insetos citado para mandioca são os altos níveis de glicosídeos cianogênicos encontrados em suas folhas (Wood, 1965). Entretanto, estudos realizados por Kriege et al. (1971) mostram que a presença de enzimas específicas em insetos pode metabolizar toxinas de plantas, tais como, cianetos. Questiona-se desta maneira o porquê destas defesas naturais serem ineficientes à predação destes insetos. Em alguns casos, estes compostos

estão presentes em altos níveis nas linhagens selvagens. Quando domesticadas, estas linhagens perdem ou reduzem a capacidade de sintetizar moléculas de defesa (Hilder et al., 1987). Outro fato importante é a co-evolução dos insetos, teorizada por Ehrlich & Raven (1964), sugerindo que a produção e o acúmulo de uma toxina pela planta são seguidos por uma resposta do predador, tal como, a detoxificação ou a excreção da toxina pelo mesmo, que o capacita a alimentar-se da planta alvo. Desta maneira, a adaptação da planta é seguida por uma contra-adaptação do predador. Essas linhagens de insetos tornam-se resistentes aos compostos de defesa presentes na planta e rapidamente tornam-se dominantes.

Embora existam métodos de controle da praga, a obtenção de variedades de mandioca que sejam efetivamente resistentes a estes insetos é um meio mais barato e eficaz.

Os insetos, como todos os seres vivos, demandam energia para crescer e manter seu metabolismo através da oxidação (respiração celular) de moléculas orgânicas. Praticamente, toda fonte de alimento pode ser utilizada por uma ou mais espécies de insetos, que podem ser classificados em: Insetos fitófagos, que se alimentam de toda a planta ou de partes dela, tais como, folhas, raízes, flores, frutos, sementes, pólen, etc. Insetos carnívoros, que se alimentam de animais inteiros ou parte deles, como sangue, pêlo ou penas e insetos saprófagos, que se alimentam de material vegetal ou animal em decomposição ou esterco. Um inseto pode ser monófago (cuja dieta é restrita a apenas uma fonte), oligófago (dieta restrita a poucas fontes) ou polífago (dieta composta por várias fontes de alimento).

A dieta dos insetos define o grupo de enzimas de maior atividade na digestão. As baratas, por exemplo, possuem um grande número de enzimas digestivas, capazes de digerir diferentes tipos de fontes de alimento. Insetos hematófagos, cuja dieta é baseada em proteínas, possuem poucas enzimas digestivas, porém estas são proteases. Quando um inseto se alimenta apenas de néctar, como os adultos da classe Lepdoptera, apenas a invertase está presente;

já as larvas fitófagas possuem proteases, lipases, amilases, maltases e invertases (Wigglesworth, 1974).

Apesar da grande diversidade da dieta entre os insetos, existem algumas necessidades básicas para que estes cresçam e se desenvolvam. Todos os insetos necessitam de fontes de energia química, geralmente carboidratos (açúcares, amido ou celulose), além de proteínas e lipídeos.

Os insetos podem sintetizar aminoácidos, porém os aminoácidos chamados essenciais devem ser ingeridos na dieta.

A necessidade de aminoácidos por parte de insetos adultos não é tão bem conhecida quanto à necessária para crescimento e metamorfose. Insetos machos adultos geralmente não requerem aminoácidos; a espermatogênese ocorre em estádios imaturos e os adultos podem ter reservas suficientes para suas necessidades metabólicas e para síntese de proteínas de glândulas acessórias.

O crescimento de lagartas de *E. ello* foi monitorado por Santos (dados não publicados) através de pesagens diárias e individuais das lagartas. O procedimento foi realizado com folhas de bico de papagaio (*Euphorbia pulcherrima*), sua hospedeira e com mamona (*Ricinus communis*), que não é considerada seu hospedeiro natural. Os resultados mostraram que lagartas alimentadas com folhas de mamona crescem de forma semelhante ao crescimento em folhas em Bico de Papagaio até 16 dias após a eclosão. A partir daí, as lagartas diminuem a velocidade de crescimento e alcançam a fase pupal em aproximadamente 30 dias (dados não publicados). Essa fase de diminuição da velocidade de crescimento das lagartas corresponde exatamente aos últimos estádios larvais, período em que é requerida grande quantidade de alimento. Essa menor velocidade de crescimento pode ser explicada do ponto de vista da inibição da tripsina, proteinase que é encontrada no intestino da lagarta.

Numerosos inibidores de proteinases de planta são efetivos contra enzimas digestivas de insetos, e por isso são conhecidos por suas funções como em processos de defesa de planta contra ataque de insetos-pestes. Estes inibidores

são em geral proteínas pequenas, estáveis e abundantes, que mostram especificidade com serina, cisteína e outros (Octavio, 2004).

2.3 Inibidores de Proteases

Proteínas de plantas que inibem vários tipos de enzimas de uma gama extensa de organismos têm sido estudadas extensivamente. Inibidores de proteases (PIs) compreendem uma das mais abundantes classes de proteínas em plantas. A maioria dos órgãos de armazenamento, como sementes e tubérculos, contêm de 1 a 10% de suas proteínas totais como PIs, que inibem diferentes tipos de enzimas (Pearce, 1982). A função dos inibidores de proteases em sementes de leguminosas é inibir irreversivelmente a ação de enzimas digestivas de animais e regular os níveis de proteases endógenas antes e durante a germinação. PIs têm sido encontradas também em folhas de diversas espécies, sugerindo seu papel na proteção vegetal do ataque de insetos e infecção microbiana (Ussuf, 2001).

Quatro classes de inibidores de proteases foram estabelecidas de acordo com suas atividades específicas: inibidores de proteinases serínicas; de proteinases cisteínicas; asparticas e de metalo-proteinases (Tabela 02).

Tabela 02 : Grupos de inibidores de proteases (Oliveira, 2003)

PROTEINASES	AMINOÁCIDO NO SÍTIO ATIVO	pH	PROTEÍNAS
Proteinases serínicas	Serina ; histidina	7 a 9	Trypsin; Chymotrypsin; Elastase, Cathepsin (+) G Papain (*); Ficin; Bromélaína.
Proteinases cisteínicas	cisteína	4 a 7	Ananain, Cathepsins B,C,H,K,L,O,S and W
Proteinases asparticas	Aspartato; triptofano	< 5	Cathepsin (+) D and E; Renin; Pepsin
Metallo-Proteinases	ion metálico	7 a 9	Carboxipeptidases A and B, aminopeptidases

O número de inibidores de proteinases de plantas identificados e isolados é grande, sendo os inibidores de proteinases serínicas os que apresentam melhor caracterização (Barrett, 1987; Ryan, 1981). Nos últimos anos, entretanto, muitos inibidores de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (Bode, 1992). Os inibidores de metalo-proteinases e de proteínas asparticas estão sendo estudados ainda em menor escala (Barret, 1987; Oliveira, 2003; Turk, 1991).

2.3.1 Inibidores de proteinases serínicas

Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases distribuídos através de seus órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos (Shewry, 1997). A maioria destes inibidores é constituída de moléculas pequenas, estáveis, abundantes e de fácil purificação (Franco, 2003 e Franco, 2004). Tais inibidores podem atuar como proteínas de reserva, como reguladores de enzimas endógenas e podem estar envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas (Walker, 1997).

O mecanismo pelo qual os inibidores de proteinases interferem no processo digestivo dos insetos se deve à diminuição da assimilação de nutrientes através de sua ligação específica a enzimas proteolíticas do intestino dos insetos, impedindo que estas executem suas funções primordiais no processo de digestão protéica e diminuindo assim o crescimento (Ryan, 1990).

Quando insetos são submetidos a uma dieta artificial contendo inibidores específicos para a principal classe de proteinase de seus intestinos, estes têm seu desenvolvimento retardado, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significativos (McManus, 1995).

A maioria dos inibidores de proteinases serínicas reage com suas enzimas cognatas por meio de um mecanismo semelhante ao que ocorre na ligação entre enzima e substrato (Grutter, 1990; Laskowski, 1980). As proteinases serínicas, em geral, apresentam um sítio ativo em forma de “canyon”, circundado por dois *loops* flexíveis. Desta maneira, somente substratos macromoleculares com formas semelhantes ou inibidores têm acesso ao sítio ativo.

Estes inibidores também foram classificados em famílias de acordo com sua massa molecular e estruturas primárias, sendo assim considerados inibidores pertencentes à mesma família por serem relacionadas evolutivamente (Laskowski, 1980).

Muitos destes inibidores, tais como inibidor de tripsina de soja e feijão de corda, afetam o desenvolvimento de vários insetos lepdópteros (Broadway, 1986), os quais possuem uma grande quantidade de proteinases serínicas em seus tratos digestórios (Applebaum, 1985).

Em geral, as classes de proteases encontradas no sistema digestivo de insetos são do tipo serina, predominante em lepidópteros, e do tipo cisteína, predominante em coleópteros e hemípteros (Broadway, 1996; Wolfson, 1990).

Os inibidores de proteinases serínicas têm sido utilizados em plantas transgênicas visando principalmente ao aumento de resistências destas contra Lepdópteros (Tabela 03) (De Leo, 2001; Gatehouse, 1999) e poucos são os casos de inibidores de proteinase serínica contra Coleópteros (Franco, 2003)

Plantas transgênicas para proteínas inseticidas (PIs) têm sido produzidas para aumentar o nível de resistência a insetos, uma vez que tais proteínas possuem tamanho pequeno, abundância e estabilidade (Franco, 2003). São usualmente muito específicas para classes particulares de enzimas digestivas de insetos. Importantes classes econômicas de pestes como Lepdoptera, Diptera e Coleoptera usam proteinases serínicas e cisteínicas em seus sistemas digestivos para degradar proteínas do alimento ingerido (Ussuf, 2001).

Informações limitadas sobre a avaliação da biossegurança da incorporação de PIs em alimentos geneticamente modificadas estão disponíveis, no entanto, os genes inibidores de proteinases são derivados de vegetais e facilmente inativados pelo cozimento. Já a introdução do gene de PI em plantas pode ser considerada uma estratégia segura do ponto de vista da alimentação humana (Ussuf, 2001).

Tabela 03: Plantas transformadas com genes que codificam para inibidores de proteases contra predadores (Ussuf, 2001 modificado).

GENE	PLANTA TRANSFORMADA	PRAGA ATIGIDA	REFERENCIA
Cowpea trypsin inhibitor (CpTI)	Tabaco	Manduca Sexta	Hilder, 1987.
	Tabaco	Spodoptera litura	Sane, 1997.
	Arroz	Sesamia inferens	Xu, 1996.
	Batata	Lacnobiaoleracea	Gatehouse, 1997
	Maçã	Coleoptera, Lepidoptera	James, 1992
	Alface, tomate	Coleoptera, Lepidoptera	Gatehouse, 1999
	Morango	Coleoptera, Lepidoptera	Graham, 1995
	Batata-doce	Coleoptera, Lepidoptera	Newell, 1995
Trypsin inhibitor PI-I	Cevada	Sitophilus Oryzae	Alfonso-Rubí, 2003
	Petunia, tabaco	Lepidoptera, Orthoptera	Beuning, 1991.
Potato PI- and PI-II	Tabaco	Manduca Sexta	Johnson, 1989
Potato PI-II	Arroz	Sesamia inferens	Duan, 1996
Potato PI-II	Videira, alface	Lepidoptera, Orthoptera	Gatehouse, 1999
Potato chymotrypsin inhibitor	Tabaco	Chrysodeixis eriosoma	McManus, 1994
Sweet potato TI	Tabaco	Spodoptera litura	Yeh, 1997
Sweet potato TI	Cauliflower	Pieris conidia	Ding, 1998
Soybean Kunitz inhibitor	Arroz	Nilaparvata lugens	Lee, 1999
Barley TI	Trigo	Sitotroga cerealella	Altpeter, 1999
Mustard TI	Arabidopsis, tabaco	Plutella xylostela	De Leo, 2001
Mustard TI	Arabidopsis, tabaco	Mamestra brassicae	De Leo, 2001.
Mustard TI	Arabidopsis, tabaco	Spodoptera litorallis	De Leo, 2001.
Tobacco PI	Tabaco, ervilha	Helicoverpa armigera	Charity, 1999

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** 1998. 574 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas.** Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998. p. 838-843.

ALFONSO-RUBÍ, J.; ORTEGO F.; CASTAÑERA, P.; CARBONERO P. DÍAZ I. : ransgenic expression of trypsin inhibitor Cme from barley in indica and japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 23-31, Feb. 2003.

ALTPETER, F.; DÍAZ, I.; MCAUSLANE, H.; GADDOUR, K.; CARBONERO, P.; VASIL I. K. Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor Cme. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 5, p. 53-63, 1999.

APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of digestion. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.** New York: Pergamon Press, 1985. v. 4, p. 279-311.

AUGUSTYNIAK, J.; DABERT, M.; WYPIJEWSKI, K. Transgenic in plant protection against viruses and insects. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakov, v. 19, n. 4, p. 561-569, 1997.

BARRIGOSI, J. A. F.; ZIMMERMANN, F. J. P.; LIMA, P. S. C. Consumption Rates and Performance of *Erinnyis ello* L. on Four Cassava Varieties. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 429-433, July/Sept. 2002.

BARRETT, A. J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. **Trends in Biochemistry Science**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 193-196, May 1987.

BELLOTTI, A.; VAN SCHOONHOVEN, A. Mites and insect pests of cassava. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 23, p. 39-67, 1978.

BEUNING, et al., Annual Queens town Molecular Biology Meeting, 1991.

BODE, W.; HUBER, R. Natural Protein Proteinase Inhibitor and their Interaction With Proteinases. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 204, n. 2, p. 433-451, Mar. 1992

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review Phytopathology**, Palo alto, v. 28, p. 113-138, 1990.

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Planta proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of the larvae *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1111-1117, Aug. 1986

BROADWAY, M. R. Dietary inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 39-53, 1996.

CARLSON, J. D.; WHALON, M. E.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 2, p. 194-200, 1991.

CHARITY, J. A.; ANDERSON, M. A.; BITTISNICH, D. J.; WHITECROSS, M.; HIGGINS, T. J. V. Transgenic tobacco and peas expressing a proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* have increased insect resistance. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 4, p. 357-365, Aug. 1999.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390 p.

CYGLER, M.; MORT, J. S. Proregion structure of members of the papain superfamily. mode of inhibition of enzymatic activity. **Biochemie**, Paris, v. 79, n. 11, p. 645-652, Nov. 1997.

DE LEO, F.; BONADÉ- BOTINO, M.; CECI, R. L.; GALERANI, R. & JOUANIN, L. . Effects of mustard trypsin inhibitors expressed in different plants on three different lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, n. 6/7, p. 593-602, Apr. 2001.

DESHIMARU, M.; YOSHIMI, S.; SHIOI, S.; TERADA, S. Multigene Family for Bowman-Birk Type Proteinase Inhibitors of Wild Soja and Soybean: The Presence of Two BBI-A Genes and Pseudogenes. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 6, p. 1379-1286, June 2004.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Multivariate genetic distance and hybrid performance of cacao (*Thebroma cacao*). **Brazil Journal of Genetic**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 63-70, Mar. 1998.

DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; MAHMOUD ABO-EL- SAAD, XU, D.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinaseinhibitor 11 gene are insect resistant. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 4, p. 494-498, Apr. 1996.

ERLICH, P. R.; RAVEN, P. H. . Butterflies and plants: a study in coevolution, **Evolution**, Washington, v. 18, n. 4, 1964.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220. (EMBRAPA – CENARGEN. Documento, 20).

FRANCO, O. L.; SANTOS, R. C.; ARAÚJO, M. A. M.; MENDES, A. C. M.; BATISTA, J. A. N.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA', M. F.; FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on Proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 343-349, June 2003.

FONTQUER, P. **Plantas Medicinales** – el dioscorides renovado. 5. ed. Barcelona: Labor, 1979. p. 187-8.

GATEHOUSE, A. M. R.; DAVISON, G. M.; NEVELL, C. A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W. D. O.; BURGESS, E. P. J.; GILBERT, R. J. C.; GATEHOUSE, J. A. Transgenic potato plants with enhanced reistance to the tomato moth, *lacanobia oleracea*: growth room trials. **Molecular Breedings**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 1-15, 1997.

GATEHOUSE, A. M. R.; NORTON, E.; DAVISON, G. M.; BABBE, S. M.; NEWELL, C. A., GATEHOUSE, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant proteinase inhibitor *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 545-558, Aug. 1999.

GRIEVÉ, M. **Castor oil plant in botanical com**: a modern herbal. Disponível em: <<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/c/casoil32.html>>. Acesso em: 20 mar. 2006.

GRUTTER, M. G.; PRIESTLE, J. P.; RAHUEL, J. GROSSENBACHER, H.; BODE, W.; HOFSTEENGE, S. R. Cristal-structure of the thrombim hirudin

complex-A novel mode of serine protease inhibition. **EMBO Journal**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2361-2365, Aug. 1990.

GUPTA, M. P. **270 Plantas medicinales iberoamericanas**. Programa Ibero Americano de Ciencia y Tecnología (CYTED) para o desarrollo – sub programa de Química Fina Farmaceutica. Santa Fé de Bogota: Convenio Sadres Bello, 1995. p. 301-303.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, London, v. 330, n. 6144, p. 160-163, Nov. 1987.

JAMES, D. J.; PASSEY, A. J.; EASTERBROOK, M. A.; SOLOMON, M. G.; BARBARA, D. J. Progress in the introduction of transgenes for pest resistance in apples and strawberries. **Phytoparasitica**, v. 20, p. 83-87, 1992. Supplemnet.

JOLY, A. B. **Botânica econômica: as principais culturas brasileiras**. São Paulo: EDUSP, 1979. p. 66.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; NA, G.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy Science of United States America**, Washington, v. 86, n. 24, p. 9871-9875, Dec. 1989.

KRIEGE, R. I.; FEENY, P. P.; WILKINSON, C. F. Detoxication enzymes in the guts of Caterpillars: A evolutionary answer to plant defenses. **Science**, Washington, v. 172, n. 3983, p. 579-581, 1971.

KRZANOWSKI, W. J. **Principles of multivariate analysis: a user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1998. 563 p.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **Journal of Genetical Physiology**, New York, v. 30, p. 291-310, 1947.

LASKOWSKY, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo alto, v. 49, p. 593-626, 1980.

LEE, S. I.; LEE, S. H.; KOO, J. C.; CHUN, H. J.; LIM, C. O.; MUN, J. H.; SONG, Y. H.; CHO, M. J. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1999.

LOXDALE, H. D.; BROOKES, C. P.; DE BARROS, P. J. Application of novel molecular markers (DNA) in agricultural entomology. In: SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E. **The ecology of agricultural pests: biochemical approaches**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 149-212.

MATSUMOTO, I.; EMORI, Y.; ABE, K.; ARAI, S. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (Maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 121, n. 3, p. 464-476, Jan. 1997.

MCMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. . Effects of Soybean (Kunitz) Tripsin Inhibitor on the Growth and Digestive Proteases of Larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 731-738, Sept. 1995.

MCMANUS, M. T.; WHITE, D. W. R.; MCGREGOR, P. G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 50-58, Jan. 1994.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* path a polimerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.

OCTAVIO L. F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 81-89, Jan. 2004.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilia Archives biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 1, p. 91-104, Jan. 2003.

PEARCE, G.; Sy. L.; RUSSEL,C.; RYAN C. A.; HASS, M. Isolaation and characterization from potato-tubers of 2 polypeptide inhibitors of serine proteinases. **Archives Biochemistry Biophysics**, Sand Diego, v. 213, n. 2, p. 456-462, 1982.

PERES, A. **Hitória del medicamento el rícino**. Fitomedicina: Barcelona, 1997. v. 5, p. 64-69.

POPOVA, G. M.; MOSHKIN, V. A. Botanical classification. In: MOSHKIN, V. A. (ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986. p. 11- 27.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**, Oxford, v. 5, p. 259-305, 1991.

RODRIGUES, R. F. O.; OLIVEIRA, F.; FONSECA, A. M. As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu. **Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 183-194, jul./dez. 2002

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: Version 1. 70. New York, 1992. p. 470

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. C. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defences Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Plant Phytopathology**, Palo Alto, n. 28, p. 425-449, 1991.

RYAN, C. A.; WALKER-SIMMONS, M. . Plant proteinases. In: MARCUS, A. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1981. v. 6, p. 321- 350.

SANE, V. A.; NATH, P.; AMINUDDIN, A.; SANE, P. V. Development of insect resistant. transgenic plants using plant genes expression of cowpea trypsin inhibitor in transgenic tobacco plants. **Current Science**, Pradesh, v. 72, n. 10, p. 741-747, May 1997.

SANTOS, R. F.; BARROS, M. A. L. **Cultivo da mamona**. Embrapa Algodão, 2003. (EMBRAPA. Sistemas de Produção 4). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/CultivodaMamona/importancia.htm>>. Acesso em: 2006.

SCHMITT, A . T. Principais insetos pragas da mandioca e seu controle In: CEREDA, M. P.; FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, J. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; VILPOUX, D. F.; SARMENTO, S. B. S. **Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americas**. Campinas, Fundação Cargill, 2001.

SCHULER, T. H.; POPP, G. M. .; KERRY, B. R.; DENHOLM, L. Insect-Resistant Transgenic Y Plants. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 168-174, Apr. 1998.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. . Plant proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. **Advances in Botanical Research**, London, n. 26, p. 136-192, 1997.

SIKES, A.; MAXCY, R. B. . Differentiation of food bacteria on the basis of their ability to utilize different proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 4, p. 1228-1232, July/Aug. 1979.

SINGH, A. P. Relative natural resistance of *Populus deltoides* clones against defoliator *Clostera cupreata* (Lepidoptera: Notodontidae) in northern India. **Agroforestry Systems**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 319-326, Aug. 2000.

SOKAL, R. R.; MICHENER. C. D. A statistical methods for evaluating systematic relationships. Bulletin Kansas University, Kansas, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS-Letters**, Amsterdam, v. 285, n. 22, p. 213-219, July 1991.

USSUF, K. K.; LAXMI, N. H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 7, p. 847-853, Apr. 2001

VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, London, v. 12, p. 245-264, 1994.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological Moleculr Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 85-97, Aug. 1999.

WALKER, A. J.; FORD, L.; MAJERUS, M. E. N.; GEOGHEGAN, A. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Characterization of the Mid-gut Digestive Proteinase Activity of the Two-spot Ladybird (*Adalia bipunctata*) and its Sensitivity to Proteinase Inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, n. 28, p. 173-180, 1997.

WELSH, L.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WIER, B. S. **Genetic data analysis**: methods for discrete population genetic data. Massachusetts, Sunderland: Sinauer, 1990. 377 p.

WIGGLESWORTH, V. B. Nutrición y metabolismo. In: WIGGLESWORTH, V. B. **Fisiología de los insectos**. Zaragoza: Acribia, 1974. p. 74-90.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBERLIK, A. R.; LIVAK, K. L.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified with arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. Diversity in digestive proteinase activity among insects. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, n. 4, p. 1089-1102, Apr. 1990.

WOOD, T. The cyanogenic glucoside content of cassava and cassava products. **Journal Science Food Agricultural**, London, v. 16, n. 6, p. 300-305, June 1965.

XU, D.; XUE, Q.; MCELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V. A.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. **Molecular Breeding**, Dordrecht, n. 2, p. 167-173, 1996.

YEH, K. W.; LIN, M. I.; TUAN, S. J.; CHEN, Y. M.; LIN, C. Y.; KAO, S. S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. **Plant Cell Report**, New York, v. 16, n. 10, p. 696-699, July 1997.

**CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE
VARIETADES DE *Ricinus communis* L. POR MEIO DE MARCADORES
RAPD**

RESUMO

PIMENTA, Maiana Reis. **Estudo da divergência genética entre variedades de *Ricinus communis* L. por meio de marcadores RAPD.** 2006. 72p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de grande importância econômica, apresentando inúmeras aplicações na área industrial e perspectivas de utilização como fonte energética. Na classificação botânica mais recente a espécie *Ricinus communis* é considerada politípica, e dividida em seis subespécies e 25 variedades botânicas que têm áreas de ocorrência individuais ou sobrepostas, diferindo não só morfologicamente, mas também, genética e ecologicamente. Algumas das diferenças entre os acessos residem na alogamia desta espécie e na grande variação no hábito de crescimento, cor da folhagem e caule, tamanho das sementes, conteúdo do óleo e porte. Apesar desta classificação morfológica separar as variedades, uma caracterização molecular pode ou não corroborar com os resultados obtidos botanicamente. Os marcadores moleculares tipo RAPD permitem análise da variabilidade genética rápida e de custo relativamente reduzido, tornando-se bastante acessível. Neste trabalho foram utilizados 39 primers RAPD dos quais 26 proporcionaram um total de 91 bandas polimórficas. Baseado no índice de similaridade de Jaccard foi estimado a matriz de similaridade genética e um dendrograma gerado para melhor visualização da divergência entre os genótipos, gerando seis grupos distintos entre as 21 variedades. O valor mínimo de similaridade de 0.98 foi determinado pelo teste de *t* ao nível de 1 % de probabilidade, acima do qual os indivíduos são semelhantes. Desta forma, tanto a diferenciação dos seis grupos pelo dendrograma quanto pelo valor mínimo de similaridade pode afirmar a grande divergência genética das variedades analisadas.

[†] Luciano Vilela Paiva – UFLA (orientador)

ABSTRACT

PIMENTA, Maiana Reis . **Study of genetic Divergence among varieties of *Ricinus communis* L. by RAPD markers.** Lavras, UFLA, 72p. (Dissertation Master in Plant Physiology)

The castor bean (*Ricinus communis* L.) is a oleagineous with a great economical importance, showing various utilizations in industrial area and perspectives to because as energetic source. In more recent botanical classification *Ricinus communis* is considered polytypic, and divided in six subspecies and 25 botanical varieties that have occurrence areas individualized or superposed, differing not only morphologically, but also genetically and ecologically. Some differences among the access are based alogamy of this specie and in the large variation in growth traits, leaf and shoot colour, seed size height and oil concentration. Unless the collection could be evaluated and something about it has been known, there is a low practical usage and for thus purpose the access need to be described correctly. The RAPD technique is a variation of PCR protocol that use only a primer with 10 nucleotides length and arbitrary sequence which anneal in genome regions and sintetize multiple products of amplification, detecting the polymorfism in the absence of specific information of nucleotide sequence of DNA template. There were used 39 primers, which 29 showed a total of 91 polymorphic bands. Based in the Jaccard Index of similarity it was estimated a genetic matrix of similarity and a dendrogram generated to improve visualization of divergence among the genotypes the minimum similarity value of 0,98 was estimated by teste *t* at 1 % of probability, and above this value the individuals are similar, so in this way the differentiation among six groups by dendrogram related to minimum similarity value it is possible to suggest the great genetic diversity among the varieties analyzed.

Luciano Vilela Paiva – UFLA (Major professor)

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE VARIEDADES DE *Ricinus communis* L. POR MEIO DE MARCADORES RAPD

1 INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de grande importância econômica, apresentando inúmeras aplicações na área industrial e perspectivas de utilização como fonte energética.

No Brasil, a ricinocultura está amplamente distribuída, tendo como destaque o cerrado, com produção altamente mecanizada e o Nordeste com papel social de grande relevância, o que assegura uma contínua fonte de renda sob o modelo dos triconsórcio (feijão, milho e mamona).

Na classificação botânica mais recente realizada por G. M. Popova e V. A. Moshkin (Moshkin, 1986), a espécie *Ricinus communis* é considerada politépica e é dividida em seis subespécies e 25 variedades botânicas, com áreas de ocorrência individuais ou sobrepostas, diferindo não só morfologicamente, mas também, genética e ecologicamente.

As seis subespécies são: *R. communis* ssp. *communis*; *R. communis* ssp. *persicus* G.Pop.; *R. communis* ssp. *sinensis* G. Pop. et V. Moshk.; *R. communis* ssp. *indicus* G.Pop. et V. Moshk.; *R. communis* ssp. *zanzibarinus* G. Pop.; e *R. communis* ssp. *ruderalis* G. Pop. et V. Moshk (Moshkin, 1986).

Há ocorrência de centenas de híbridos e variedades de mamona (Beltrão, 2001), algumas das diferenças entre os acessos residem na grande variação no hábito de crescimento, cor da folhagem e do caule, tamanho das sementes, conteúdo do óleo e do porte, por isso os acessos necessitam ser descritos apropriadamente (Chapman, 1989).

Marcadores moleculares, como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), são poderosas ferramentas que têm facilitado o estudo de diversas áreas da biologia, pura ou aplicada, incluindo questões de identificação

de variedades, evolução e genética de populações, análises de características quantitativas em genética de populações, entre outras (Symondson & Liddell, 1996).

O presente trabalho teve como principal meta a caracterização molecular dos acessos existentes na estação experimental do Setor de Agroclimatologia da Universidade Federal de Lavras através do uso de oligonucleotídeos do tipo RAPD, com padrão de bandas polimórficas suficientes para se estudar a divergência genética entre as diferentes variedades, uma vez que são todos pertencentes à mesma espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Folhas jovens de 21 variedades de *Ricinus communis* L. identificadas como: Vermelha ornamental, IAC 80 verde, Verde selvagem, Verde asselvajada, Guarani repicada, Guarani verde, Grande 100 %, Guarani grande, Grande pelada, Mirante, Vermelha selvagem, Guarani normal, IAC 80 vermelha, Verde precoce, Guarani normal pelada, IAC 226, Coty, Precoce pelada, Rosa cacho diferente e Verde produtiva foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e levadas ao Laboratório Central de Biologia Molecular, as quais foram armazenadas em freezer -80 °C para posterior utilização.

2.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído segundo o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com algumas modificações. Em síntese, cerca de 0,5g de tecido foliar fresco foi triturado em N₂ líquido, utilizando-se pistilo e almofariz até a obtenção de um pó fino. Em seguida, microtubos de 1 mL gelados foram

preenchidos até a metade com o pó macerado. Imediatamente, 600 µL de tampão de extração CTAB (p/v), (1 mol/L Tris-HCl pH 8,0, 1,4 mol/L NaCl, 0,02 mol/L EDTA pH 8,0, 1% sarcosil (p/v), 1% PVP (p/v)) e 2% β-mercaptoetanol (v/v) pré-aquecido a 65°C foram adicionados e misturados ao triturado foliar. Essa mistura foi mantida em banho-maria a 65°C, por 1 hora, com homogeneização a cada 10 minutos, visando ao contato do tampão com o material vegetal. Após este período, a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos.

Em seguida, 1 volume (600 µL) de solução de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e o tubo foi levemente agitado por 10 minutos, visando à emulsificação das fases. A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 18.000 x g, por 5 minutos, à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante (fase aquosa) transferido para um novo microtubo. A lavagem do sobrenadante com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi realizada novamente, seguindo os mesmos volumes, tempos de agitação e centrifugação que o anterior.

Após a segunda lavagem, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e 900 µL de isopropanol gelado foram adicionados para promover a precipitação do DNA. O microtubo foi, então, invertido levemente, para aumentar a precipitação e incubado por 30 minutos a -20 °C. Após este período, a solução foi centrifugada a 18.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado por inversão; 300 µL de etanol 70 % (v/v) gelado foram adicionados e o tubo foi levemente agitado para que o sedimento e as paredes fossem lavados. O microtubo foi centrifugado a 18.000 x g por 3 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento foi, então, seco em câmara de fluxo laminar por 1 hora e resuspenso em 30µL de água ultra-pura.

A quantificação do DNA foi estimada em gel de agarose 1 %, pela comparação com padrões de DNA de concentração conhecida. Para a

quantificação em gel de agarose 1 % (m/v) corado com 1 μ L de brometo de etídeo (0,01 %), foi realizada eletroforese a 100 V em tampão TAE (0.001 mol/L EDTA pH 8,0; 0.04 mol/L TRIS pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por 1 hora. Após a eletroforese, o gel foi fotografado pelo equipamento EDAS 290 (Kodak).

Para cada amostra de DNA extraído (estoque total), foi preparado um estoque de uso na concentração de 10 ng/ μ L. Ambos foram congeladas a -20 °C.

2.2 Amplificação via RAPD

Foram utilizados 39 oligonucleotídeos decâmeros, pertencentes às séries OPM, OPN, OPP e OPJ (OPERON Technologies).

As reações foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), em um volume de 25 μ l contendo: Tampão da enzima 1X; 3mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 0,3 μ M de primer; 1 μ L de Taq polimerase.

As reações de amplificação foram realizadas, utilizando-se um programa com desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por desnaturação a 94 °C por 59 segundos, anelamento a 35 °C por 59 segundos, e extensão a 72 °C por 2 minutos. Os passos de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 45 vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão a 72 °C por 5 minutos.

Para a visualização do DNA amplificado foi utilizado gel de agarose 1 % (m/v) corado com 1 μ L de brometo de etídeo (0,01 %) em eletroforese a 70 V em tampão TAE (0.001 mol/L EDTA pH 8,0; 0.04 mol/L TRIS pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi fotografado pelo equipamento EDAS 290 (Kodak).

2.3 Análise estatística dos dados moleculares

A presença ou a ausência de bandas RAPD foram marcadas por meio de interpretações visuais dos géis fotografados. Os dados foram transformados em matriz de 1 (presença) e 0 (ausência) de todos os genótipos e posições dos fragmentos marcados.

A estimativa de similaridade genética de cada par de variedades foi efetuada pelo coeficiente de similaridade genética de Jaccard (Anderberg, 1973), onde:

$$sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

as variáveis do referido índice foram obtidas conforme demonstrado na tabela 04.

Tabela 04: Possíveis resultados de comparações de dois genótipos por marcadores RAPD. (a) Presença de banda em ambos os genótipos. (b) bandas exclusivas do genótipo j, (c) bandas exclusivas do genótipo i e (d) ausência de bandas em ambos os genótipos

	Genotipo i	1	0
Genotipo j			
1		a (1,1)	b (0,1)
0		c (1,0)	d (0,0)

As similaridades obtidas foram transformadas em medidas de distâncias genéticas pela equação

$$dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$$

A representação das distâncias foi realizada através de um dendograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares

não ponderados UPGMA pelo programa NTSYS-PC (Rohlf, 1992), que agrupou os genótipos segundo o método da média aritmética entre pares não ponderados.

Os erros associados a cada distância foram estimados pela expressão demonstrada abaixo:

$$gs_m = 1 - (t \cdot \bar{S}_{gs})$$

na qual:

gs_{ij} - similaridade

t - valor tabelado com n -a graus de liberdade com a correlação de Bonferroni

m - número de comparações

S_{gs} - média dos erros das estimativas de similaridades consideradas no dendograma

As plantas geneticamente diferentes foram identificadas no dendograma a partir da estimativa de valor máximo significativo de similaridade estimado por meio do teste t , utilizando-se a expressão:

$$S_{gs} = [gs_{ij} (1 - gs_{ij}) / (n-1)]^{-5}$$

Na qual:

S_{gs} – erro associado a cada similaridade

gs_m - valor da similaridade máxima de similaridade

n - número de bandas obtidas

gs_{ij} - similaridade

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 39 primers e destes, 26 apresentaram 91 bandas úteis para a análise de divergência genética. O número de bandas polimórficas variou entre 1 (OPP2, OPP4, OPP6, OPP8, OPP12, OPN1, OPM13 e OPJ5) e 9 (OPP17) (Tabela 05).

Tabela 05: Bandas polimórficas obtidas pelos primers RAPD

Primers	Bandas Polimórficas	Primers	Bandas Polimórficas
OPP2	1	OPP20	2
OPP3	8	OPN1	1
OPP4	1	OPN17	2
OPP5	6	OPN20	4
OPP6	1	OPM2	3
OPP8	1	OPM4	7
OPP9	4	OPM7	6
OPP11	7	OPM13	1
OPP12	1	OPM14	7
OPP14	2	OPJ1	5
OPP16	2	OPJ5	1
OPP17	9	OPJ10	3
OPP19	2	OPJ13	3

Dudley (1994), concluiu que resultados obtidos com número de bandas entre 50 e 100 tendem a coincidir com os de pedigree. Colombo (1998), trabalhando com divergência genética de mandioca, acrescentou que o mesmo número é suficiente para estimar relações genéticas inter e intraespecíficas. Desta forma, as 91 bandas encontradas estão de acordo com os números aceitáveis para estudos de divergência genética.

O número de bandas polimórficas por primer foi de 2,34. Meneses (2004), obteve comparável grau de polimorfismo (2,31 bandas por primer) ao trabalhar com cinco acessos de mamona, mesma espécie utilizada no presente estudo.

Tomando como base os 91 fragmentos obtidos, foi estimada uma matriz de distância genética, com auxílio do índice de similaridade de Jaccard, relacionando todas as variedades duas a duas (Tabela 06). A distância genética média das 210 estimativas obtidas foi de 0,61 com amplitude de 0,20 a 0,75. A menor distância foi obtida entre as variedades 1 e 18 (Grande pelada e Coty) e as maiores entre as variedades 3 e 5 (Grande 100% e Guarani normal) e entre 12 e 21 (Verde precoce e Nordestina) (Tabela 06). As distâncias menores estão associadas aos genótipos mais semelhantes entre si, ao contrário das distâncias maiores.

Tabela 06: Matriz de similaridade genética entre as 21 variedades de *Ricinus communis* obtida pelo índice de Jaccard. A menor distância (0,2) foi obtida entre as variedades 1 e 18 e as maiores (0,75) entre as variedades 3 e 5 e as variedades 12 e 21.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	1																					
2	0,5	1																				
3	0,48	0,47	1																			
4	0,46	0,53	0,64	1																		
5	0,56	0,5	0,75	0,6	1																	
6	0,44	0,6	0,55	0,63	0,55	1																
7	0,38	0,53	0,54	0,63	0,61	0,72	1															
8	0,47	0,59	0,5	0,61	0,5	0,66	0,56	1														
9	0,43	0,5	0,5	0,57	0,56	0,58	0,54	0,62	1													
10	0,51	0,43	0,51	0,58	0,51	0,56	0,5	0,58	0,57	1												
11	0,4	0,61	0,5	0,58	0,5	0,66	0,55	0,64	0,66	0,54	1											
12	0,44	0,53	0,54	0,55	0,51	0,71	0,56	0,64	0,57	0,5	0,68	1										
13	0,5	0,54	0,52	0,5	0,47	0,57	0,45	0,56	0,57	0,53	0,65	0,62	1									
14	0,48	0,52	0,48	0,51	0,45	0,55	0,43	0,57	0,56	0,54	0,6	0,57	0,64	1								
15	0,51	0,56	0,54	0,55	0,49	0,73	0,56	0,64	0,57	0,52	0,64	0,72	0,65	0,7	1							
16	0,44	0,57	0,5	0,57	0,47	0,68	0,54	0,62	0,52	0,56	0,66	0,63	0,57	0,55	0,7	1						
17	0,42	0,57	0,5	0,5	0,44	0,61	0,54	0,59	0,47	0,48	0,56	0,6	0,57	0,52	0,62	0,68	1					
18	0,2	0,38	0,33	0,33	0,25	0,53	0,45	0,41	0,36	0,31	0,51	0,48	0,4	0,36	0,48	0,5	0,5	1				
19	0,41	0,5	0,49	0,46	0,43	0,65	0,5	0,56	0,54	0,47	0,66	0,63	0,5	0,55	0,63	0,65	0,57	0,48	1			
20	0,37	0,5	0,45	0,48	0,42	0,67	0,48	0,55	0,48	0,49	0,57	0,58	0,5	0,5	0,61	0,71	0,56	0,47	0,71	1		
21	0,43	0,58	0,56	0,58	0,5	0,65	0,58	0,63	0,59	0,49	0,71	0,75	0,58	0,66	0,74	0,69	0,62	0,54	0,69	0,64	1	

Para uma melhor visualização da divergência entre os genótipos, foi realizado o agrupamento, utilizando o método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre os pares ponderados (UPGMA) e obtido o dendograma (Figura 02), onde se observa claramente que as variedades 1 e 18 (Grande pelada e Coty), que obtiveram o menor valor de similaridade (0,20), são colocados de forma mais distante no dendograma, assim como as variedades 3 e 5 (Grande 100% e Guarani normal) e 12 e 21 (Verde precoce e Nordestina), que obtiveram o maior valor de similaridade (0,75) dispostas como grupos mais próximos entre si que entre as demais variedades plotadas no dendograma.

A utilização do método do UPGMA permitiu a separação das variedades estudadas em 6 grupos distintos, denominados I, II, III, IV, V e VI (Tabela 07). Os grupos de número I, II, V e VI são formados por apenas uma variedade, o grupo IV apresenta quatro variedades, já o grupo III é formado por treze variedades. O fato de 61,9 % dos genótipos terem sido agrupados no grupo III permite inferir sobre o parentesco entre eles.

Pode ser observado na figura 03, além dos grupos formados, um ponto de corte ao nível de 1% de probabilidade determinado por meio do teste de t e denominado valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são semelhantes (Castanheira, 2001). Observa-se que é de 98% o valor mínimo de similaridade entre os indivíduos analisados e, mais uma vez, a divergência entre as variedades testadas é demonstrada.

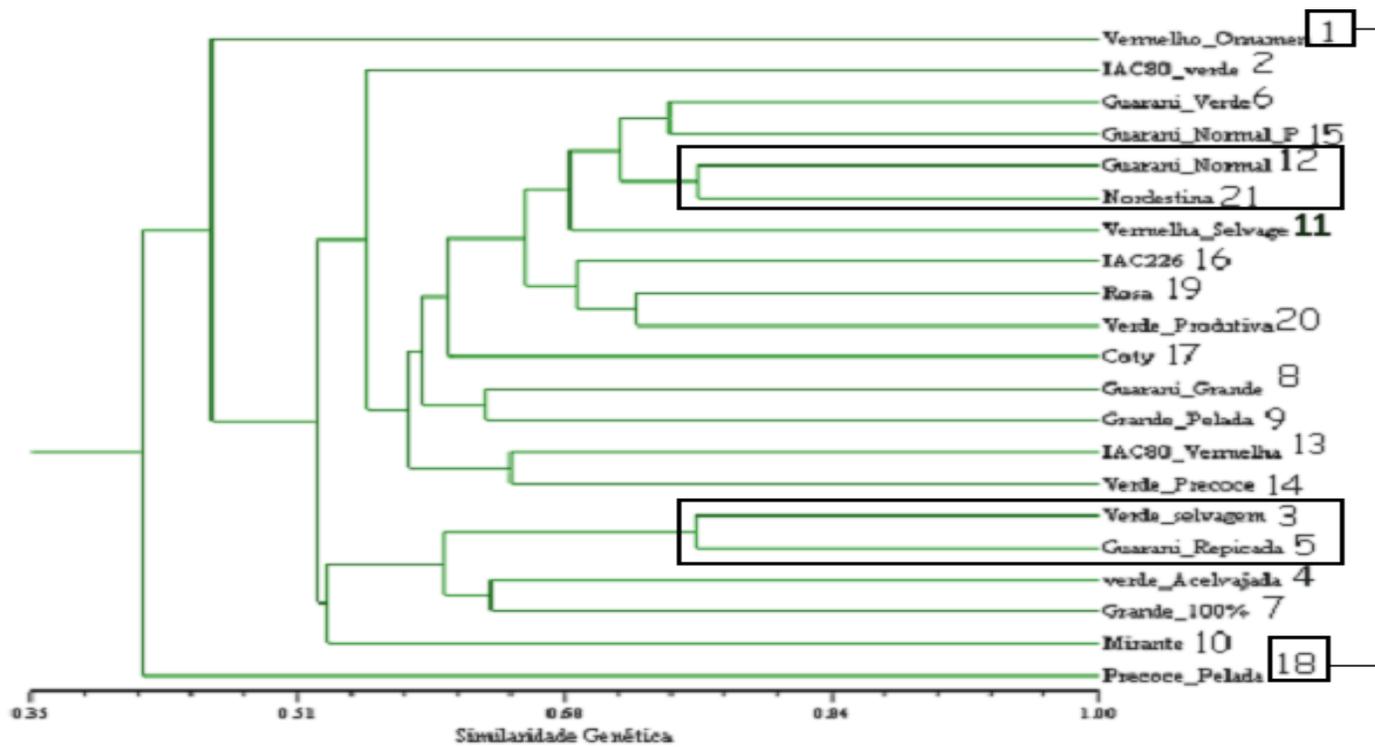


Figura 02: Padrão de similaridade genética obtida entre os 21 variedades de mamona, definido pelo critério de agrupamento UPGMA com base na média de Jaccard.

Tabela 07: Agrupamento de indivíduos de *Ricinus communis* L. Com base no polimorfismo de bandas obtidas por RAPD e na análise da distância genética por UPGMA

Grupo	Indivíduos
I	Vermelha ornamental
II	IAC 80 verde
III	Guarani verde
	Guarani normal pelada
	Guarani normal
	Nordestina
	Vermelha selvagem
	IAC 226
	Rosa cacho diferente
	Verde produtiva
	Coty
	Guarani grande
	Grande pelada
	IAC 80 vermelha
	Verde precoce
	IV
Guarani repicada	
Verde asselvajada	
V	Grande 100%
	Mirante
VI	Precoce pelada

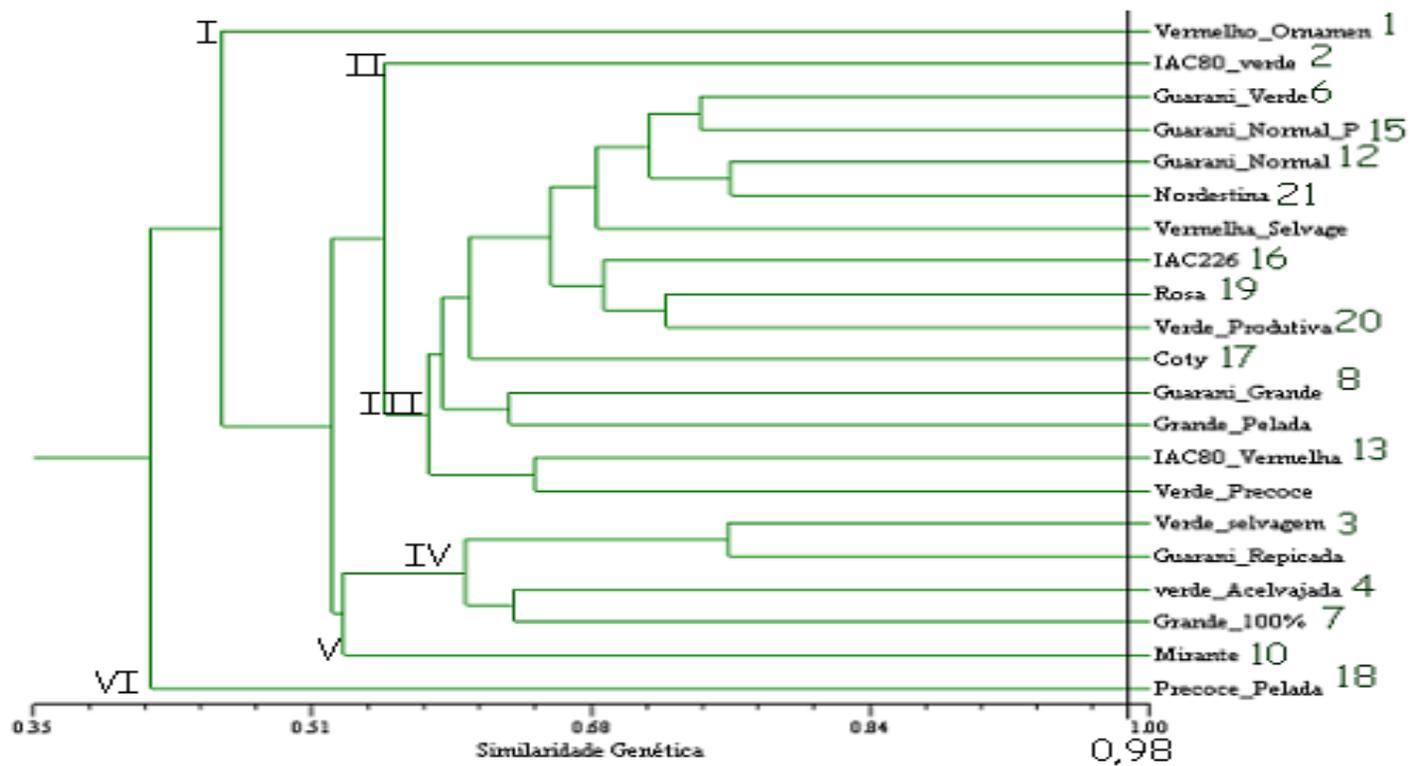


Figura 03: Dendrograma obtido pelo método do UPGMA apresentando os seis distintos grupos formados e o ponto de corte ao nível de 1% de probabilidade obtido pelo teste de *t*.

4 CONCLUSÕES

As variedades testadas apresentaram alta divergência entre elas.

A menor similaridade foi obtida entre os indivíduos 1 e 18 (Grande pelada e Coty) e a maior entre os indivíduos 3 e 5 (Grande 100% e Guarani normal) e entre 12 e 21 (Verde precoce e Nordestina).

As distâncias genéticas classificam os indivíduos em seis grupos distintos, sendo 61,9 % dos genótipos encontrados no grupo III.

O valor de similaridade máxima foi de 98 %, a partir do qual não existem diferenças entre as variedades.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERBERG, M. R. **Cluster analysis for applications**. New York: Academic press, 1973.

BELTÃO, N. E. M.; SILVA, L. C.; VASCONCELOS, O. L.; AZEVEDO, D. M. P.; VIEIRA, D. J. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2001. p. 37-61

CASTANHEIRA, A. L. M. **Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão**. 2001. 76 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHAPMAN, C. Principles of germplasm evaluation In: STALKER, H. T.; CHAPMAN, C. (Ed.). **Scientific management of germplasm, characterization, evolution, evaluation and enhancement**. Roma: International Board for Plant Genetic Resource, 1989.

COLOMBO, C. Genetic diversity characterization os cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) RADP markers. **Genetics and Molecular Biology** Ribeirão Preto v.21, n1, 1998. p. 105-113

DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: _____. **Analysis of molecular marker data** Corvallis: Oregon, 1994. p.3-7.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documento, 20).

MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. S.; TAVARES, A. C.; COUTINHO, T. C.; SILVA, S. C.; MILANI, M.; VIDAL, M. S. Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética *Ricinus communis* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, **Anais...** 2004.

MOSHKIN, V. A. **Castor**. New Delhi: Oxonian Press, 1986. 315 p.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: Version 1. 70**. New York, 1992. 470 p.

SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E. **The ecology of agricultural pests:**
biochemical approaches. London: Chapman & Hall, 1996. 517 p.

**CAPÍTULO 3- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES DE
Erinnyis ello L. NA PRESENÇA DE INIBIDORES EXTRAÍDOS DE
FOLHAS DE MAMONA**

RESUMO

PIMENTA, Maiana Reis. **Atividade enzimática de proteases de *Erinnyis ello* L. na presença de inibidores extraídos de folhas de mamona.** 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Em geral, as plantas possuem um variado grau de resistência a insetos, desenvolvida a partir dos vários mecanismos de defesa utilizados por elas durante a evolução. Entre eles, incluem-se as proteínas PR (*Pathogenesis-related proteins*), que são divididas em 14 famílias (PR-1 a PR-14) classificadas de acordo com sua seqüência aminoacídica, relações serológicas e atividades enzimática e biológicas. Essas são variadas e podem apresentar diferentes tipos de ação. As proteínas classificadas como PR-6 são os inibidores de proteases e são sintetizadas pela planta hospedeira em situações patológicas. São moléculas, que na maioria dos casos, têm massa molecular entre 10 e 90 kDa. Os inibidores de proteases mais conhecidos e estudados são aqueles que afetam a atividade de serino-proteases, cisteino-proteases, proteases aspárticas e metaloproteases, que são os quatro grandes grupos aos quais pertencem as enzimas proteolíticas. Inibidores de tripsina, uma serino-protease, são os mais estudados, sendo as famílias Solanaceae, Leguminosae e Gramineae as mais investigadas, podem ser divididos em inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk de acordo com o tamanho, conformação ativa de pontes dissulfeto, presença de um ou dois sítios ativos e estabilidade. No caso específico da família Euphorbiaceae, foi verificada a redução no crescimento da praga *Erinnyis ello* quando alimentadas com folhas de mamona. Com o objetivo de avaliar a presença destes inibidores de proteases em variedades de mamona, foram feitos ensaios de atividade enzimática utilizando-se extrato de mamona como fonte de inibidor, conteúdo do tubo digestivo de *E. ello* como fonte de tripsina e BAPNA como substrato. A atividade foi analisada também com o extrato de mamona fervido, fonte do inibidor, para testar sua termoestabilidade. Todas as variedades de mamona testadas apresentaram inibição a tripsina de *E. ello*, mesmo quando o extrato foi fervido a 100 °C por cinco minutos. Foi observada em algumas variedades a presença de inibidores resistentes à temperatura submetida, apresentando porcentagem de inibição no extrato fervido inferior à obtida no extrato *in natura*. Embora a partir do resultado possa-se sugerir a presença de inibidores do tipo Bowman-Birk, mais resistentes à temperatura e do tipo Kunitz, menos estáveis, outras análises devem ser realizadas para que isso possa ser afirmado.

Comitê orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (orientador), Custódio Donizeti Santos (UFLA)

ABSTRACT

PIMENTA, Maiana Reis. **Enzimatic activity of proteases from *Erinnyis ello* L. in presence of inhibitors extrated from castor bean leaves** Lavras, UFJF 2006 72p. (Dissertation- Master in Plant Phisiology)

Usually the plants have a varied resistance degree to insects, developed from defense mechanisms used by them during evolution. Among them, there are included PR proteins (*Pathogenesis related proteins*), that are divided in 14 families (PR-1 to PR- 14) classified according with aminoacid sequence, serological relations and enzymatic biological activities. There are varied and can show different mode of action. The proteins classified as PR-6 are the proteases inhibitor and are synthesized by host plant in pathological situations. In most of the cases, they are molecules with molecular weight between 10 and 90 Kda. The most known and studied protein inhibitors are these ones that affect the serim proteases aspartic proteases, aspartic proteases and metalloproteases activities that are the four main groups which belong the proteolytic enzymes trypsin inhibitor, a serine protease, are the most studied, being the Solanaceae, Leguminosae and Graminae the most studied, the inhibitors can be divided in Kunitz and Bowman-Birk type according with the size, active conformation of disulfite bond, presence of one or two active site and stability. In the specific case of Euphorbiaceae family, it was verified a reduction in *Erinnis ello* pest when fed with castor bean leaves. This paper cumed to evaluate the presence of these protease inhibitors in castor bean varieties, for this purpose enzymatic assays were made using castor bean extracyt as inhibitor source, the content of digestive tube from *E. ello* as trypsin source and BAPNA as substrate. The activity was also evaluated in boiled castor bean extract, source of inhibitor, to test the thermostability. All the castor bean varieties tested showed the inhibition of *E. ello* trypsin, also when the extract was boiled at 100 °C during five minutes. It was observed in some varieties the presence of inhibitors resistant to temperature tested, showing the inhibition percentage in boiled extract lower than that one obtained in natura. Based in this result, it is possible to suggest that the presence of Bowman-Birk inhibitor type, more resistant to temperature and that ones similar to Kunitz type, less stable, other analysis should be done to obtain a more effective result

^{*} Guidance committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Major professor), Custódio Donizeti Santos (UFLA)

CAPÍTULO 3- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES DE *Erinnyis ello* L. NA PRESENÇA DE INIBIDORES EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE MAMONA

1 INTRODUÇÃO

Plantas, microrganismos e animais contêm proteínas capazes de formar complexos proteína-proteína, reversíveis ou não, com enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da atividade das mesmas por competição pelo sítio catalítico. São denominados de acordo com a protease inibida e/ou sua fonte como, por exemplo, o inibidor de tripsina de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Kunitz, 1947).

Os inibidores de proteases mais conhecidos e estudados são aqueles que afetam a atividade de serino-proteases, cisteíno-proteases, proteases aspárticas e metaloproteases, que são os quatro grandes grupos aos quais pertencem as enzimas proteolíticas (Laskowski & Kato, 1980). Os inibidores de tripsina, uma serino-protease, são os mais estudados, sendo as famílias Solanaceae, Leguminosae e Gramineae as mais investigadas quanto à atividade destes inibidores por representarem importantes fontes de alimentos (Richardson, 1991).

Os inibidores de proteases são proteínas de ampla distribuição no reino vegetal capazes de inibir as atividades da tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase (Bender, 1987; Xavier-Filho & Campos, 1989). Geralmente, são denominados inibidores da primeira enzima contra a qual foram testados e na maioria destas pesquisas a tripsina foi a mais investigada (Sgarbieri & Whitaker, 1982).

A pesquisa de inibidores de proteases foi centrada, principalmente, nos inibidores de tripsina encontrados nas sementes de leguminosas, mais especificamente na soja, os quais foram supostamente responsabilizados pelo baixo valor nutritivo de leguminosas cruas (Xavier-Filho & Campos, 1989).

Os inibidores de proteases da soja são classificados em duas categorias: os de alto peso molecular, com aproximadamente 20.000 daltons, que apresentam duas pontes dissulfeto, 181 resíduos de aminoácidos e possuem especificidade primária para tripsina e os de baixo peso molecular, com aproximadamente 6.000 e 10.000 daltons, com alta proporção de ligações dissulfeto, 71 resíduos de aminoácidos e capacidade para inibir tripsina e quimotripsina em sítios de ligação independentes. Estes inibidores são referidos como tipo Kunitz e Bowman-Birk, respectivamente (Liener, 1994) (Figura 4 “a” e “b”)

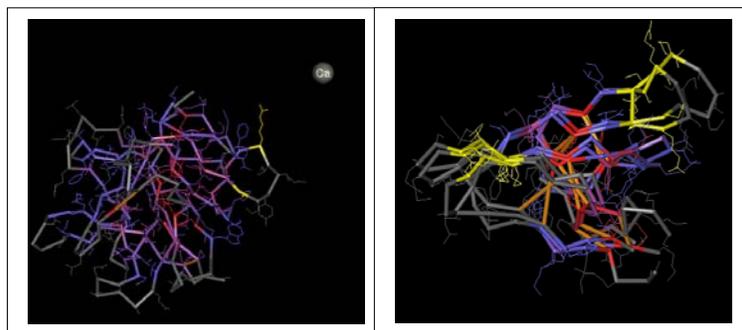


Figura 04 a) Inibidor de tripsina tipo Kunitz e b) Bowman-Birk. Em amarelo sítios de ligação com as proteases específicas (1 para Kunitz e 2 para Bowma-Birk); em vermelho pontes dissulfeto (mais numerosas em Bowman-Birk que em Kunitz).

A seqüência completa de aminoácidos presentes em inibidores de tripsina já foi obtida de um número considerável de inibidores típicos de sementes de leguminosas, os quais foram classificados como inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk (Xavier-Filho & Campos, 1989). A estabilidade térmica dos inibidores de proteases depende de seu peso molecular e do grau de estabilização da conformação ativa por pontes de dissulfeto (Belitz & Grosch, 1988). O

inibidor Bowman-Birk da soja é mais estável ao calor e às variações do pH do que o inibidor Kunitz, devido às diferenças de tamanho e número de ligações dissulfeto (Sgarbieri & Whitaker, 1982).

Folhas de mandioca podem ser atacadas pela larva de *Erinnyis ello*, uma praga importante de plantas pertencentes à família das Euphorbiaceae. Embora a mamona seja pertencente a família Euphorbiaceae, foi observado um decréscimo no crescimento da praga quando alimentadas com folhas desta espécie, indicando que um inibidor fator antinutritivo poderia estar presente (dados não publicados), o que causaria o decréscimo no crescimento de *E. Ello*. Análises posteriores mostraram a presença de inibidor de tripsina de *E. ello* em folhas de mamona nas condições alcalinas de seu tubo digestivo.

Não existem relatos até o momento da presença de inibidores de tripsina em Euphorbiaceae e tão pouco em *Ricinus communis* L.. A mamona representa uma fonte promissora para o isolamento de genes de inibidores de tripsina, uma vez que *Erinnyis ello* não se alimenta de sua folhas. Assim, os objetivos do presente trabalho foram analisar:

-A presença de inibidores de tripsina em folhas de 22 variedades de *Ricinus communis* L. através da atividade de tripsina do conteúdo intestinal de *Erinnys ello*..

-A atividade de tripsina de *Erinnys ello* quando em contato com extrato protéico fervido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração do inibidor de tripsina de folhas de mamona

Folhas jovens do quarto nó das 22 seguintes variedades de mamona (*Ricinus communis*) Grande Pelada, Guarani grande, Grande 100%, Guarani normal, Guarani verde, Guarani Normal Pelada, IAC 80 Verde, Branquinha, Mirante, Vermelha ornamental, Guarani Repicada, Verde Precoce, Paraguaçu, IAC 80 Vermelha, IAC 226, Verde asselvajada, Vermelha semente grande, Coty, Rosa cacho diferente, Verde precoce produtiva, Nordeste e Precoce pelada foram coletadas na Estação Experimental do Departamento de Engenharia Florestal e acondicionadas em sacos plásticos dentro de caixa de isopor com gelo. As folhas tiveram seus pecíolos retirados, foram lavadas suavemente em água de torneira, enxaguadas com água destilada, enxutas suavemente com papel absorvente e cortadas em pequenos pedaços utilizando uma tesoura. Dez gramas de folhas foram homogeneizados em nitrogênio líquido com 0.2g de ácido ascórbico (2 % p/p) e 0.2 g de PVP insolúvel (1 % p/p). A massa homogeneizada foi colocada em tubos de centrífuga com 40 mL de tampão glicina-NaOH, 0.1 M, pH=9,0, em seguida colocadas em banho de gelo com agitação orbital suave por 30 minutos e centrifugada a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante, utilizado como fonte de inibidor de tripsina, foi recolhido, identificado e guardado em freezer.

2.2 Extração de tripsina de *Erinnyis ello*

2.2.1 *Erinnyis ello*

Os ovos de *Erinnyis ello* foram coletados em folhas de mandioca em campos de multiplicação de variedades localizados na Universidade Federal de

Lavras. Após a eclosão, as lagartas foram criadas em placas de Petri e a partir do terceiro estágio larval, transferidas para potes plásticos, sob condições naturais de fotoperíodo e alimentadas diariamente com folhas frescas de mandioca. No quinto e último estágio, as lagartas foram dessecadas para preparar as amostras do tubo digestivo (Figura 05)

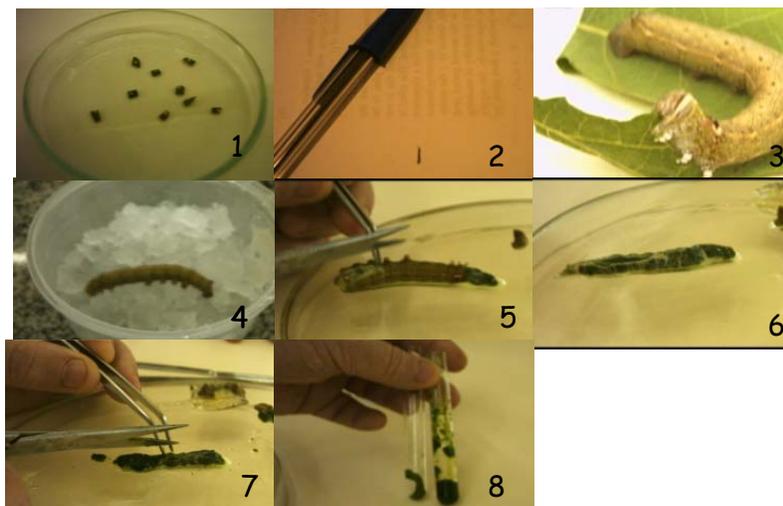


Figura 05: Criação e dessecação de larvas de *Erinnyis ello* L.; 1- Ovos de *Erinnyis ello* coletados em campo de cultura de mandioca; 2- Lagarta no primeiro instar (a caneta foi colocada para efeito de comparação); 3- Larva já no quinto e último instar (12 dias); 4- Larva no último instar em banho de gelo; 5- início da dessecação larvar; 6- conteúdo do intestino ainda envolto pelo mesmo; 7- retirada do intestino e 8- intestino e conteúdo separados em tubos de ensaio

2.2.2 Obtenção da enzima digestiva

Lagartas, no quinto e último estágio larval, foram colocadas sob gelo durante aproximadamente 15 minutos. Após esse período, foram dessecadas em sua própria hemolinfa e o conteúdo do intestino médio (ventrículo) retirado para análise.

As amostras do conteúdo do intestino médio foram homogeneizadas em tampão glicina-NaOH, 0,1 M, pH=9,0 com auxílio de um homogeneizador tipo

Potter. As preparações foram filtradas em malha de nylon de 75 micrômetros e centrifugadas a 10.000 x g, a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C até sua utilização com fonte de tripsina.

2.3 Ensaio da atividade inibitória de tripsina

A análise de inibição de tripsina de *E. ello* foi realizada a partir de incubação a 37 °C de 0,2 mL de tripsina (sobrenadante do conteúdo do intestino médio) convenientemente diluída, com 0,2 mL de inibidor de tripsina (sobrenadante do extrato de mamona) e 0,8 mL de benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA) 0,87 (concentração final) por pelo menos 4 períodos de tempos. Após cada período, a reação foi interrompida com 0,2 mL de ácido acético 30 % e a absorbância foi lida a 410 nm x água.

A atividade da tripsina foi determinada em todos os ensaios de acordo com Engelen, 1961 e os resultados expressos em mU/mL de extrato. Uma miliunidade de tripsina (mU) foi considerada como a formação de 1 μmol de p-nitroanilida por minuto de reação. Uma unidade de tripsina inibida (UTI) foi considerada como a quantidade de p-nitroanilida que deixou de ser produzida pela presença do inibidor, em outras palavras, a diferença entre a atividade na ausência do inibidor e na presença do mesmo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio da atividade inibitória de tripsina

A tripsina de *Erinnyis ello* L. foi utilizada em três experimentos feitos em triplicata e identificados como Ensaio, Inibição e Ensaio Fervido

No “ensaio”, a atividade foi determinada incubando-se a 37 °C por 30, 60, 120 e 150 minutos e testada em 0.8 mL de BAPNA 0.87 mM (10.90 mg

BAPNA + 0,2 mL DMSO em 20 mL de tampão gly-NaOH 0,1 M, pH = 9,0) adicionados a 0.2 mL de enzima de tripsina de *Erinnyis ello* L. diluída 30 X e 0,2 mL de água. A reação foi parada com 0,2 ml de ácido acético 30% e a reação de cor lida a 410 nm x água.

Na “inibição”, a atividade de tripsina recuperada foi obtida utilizando-se o mesmo protocolo descrito para o “ensaio”, substituindo-se, entretanto, a água pelo extrato proteico *in natura*, fonte do inibidor.

Para o experimento denominado “ensaio fervido”, o mesmo protocolo foi também utilizado, trocando-se o extrato proteico *in natura* pelo extrato proteico fervido por cinco minutos (Tabela 08).

Tabela 08: Unidades de tripsina presentes no tubo digestivo (Ensaio) e unidades de tripsina inibidas nos extratos de mamona não fervido (Inibição) e fervido.

	Variedades	Ensaio	Inibição		Fervido	
		um/mL	mUTI/mL	(%)	mUTI/mL	(%)
1	Grande Pelada	76,4	21,5	28,1	19,1	25
2	Guarani grande	78,8	28,6	36,4	21,5	27,3
3	Grande 100%	71,6	18,6	26,0	26,3	36,6
4	Guarani normal	88,3	38,2	43,2	38,2	43,2
5	Guarani verde	78,8	18,6	23,6	14,3	18,1
6	Guarani Normal Pelada	64,4	26,3	40,7	23,9	37,0
7	IAC 80 Verde	64,4	21,5	33,3	19,1	29,6
8	Branquinha	74,0	16,7	22,6	21,5	29,0
9	Mirante	64,4	21,5	33,3	19,1	29,6
10	Vermelha ornamental	81,1	40,6	50,0	31,0	38,2
11	Guarani Repicada	78,8	28,6	36,4	19,1	24,2
12	Verde Precoce	76,4	28,6	37,5	28,6	37,5
13	Paraguaçu	74,0	31,0	41,9	23,9	32,3
14	IAC 80 Vermelha	78,8	59,7	75,8	59,7	75,7
15	IAC 226	74,0	16,7	22,6	31,0	41,9
16	Verde asselvajada	90,7	52,5	57,9	47,7	52,6
17	Vermelha semente grande	88,3	40,6	45,9	28,6	32,4
18	Coty	88,3	23,9	27,0	28,6	32,4
19	Rosa cacho diferente	102,6	50,1	48,8	43,0	41,9
20	Verde precoce produtiva	62,1	28,6	46,2	28,6	46,1
21	Nordestina	64,4	31,0	48,1	16,7	25,9
22	Precoce pelada	64,4	21,5	33,3	31,0	48,1

A porcentagem média de inibição foi de 40,9%, com amplitude entre 22,6 % para Branquinha e 75,8 % para IAC 80 Vermelha. As variedades Grande pelada, Grande 100 %, Guarani verde, Branquinha, IAC 226 e Coty, apresentaram as menores taxas de inibição, enquanto que IAC 80 vermelha foi a que apresentou a maior taxa de inibição, inibindo aproximadamente 75 %.

A maior inibição da cultivar IAC 80 vermelha pode estar relacionada com a condição da planta no momento de coleta, a qual se apresentava bastante danificada, sem folhas jovens e aquelas existentes encontravam-se amareladas e com sinais de ataque por patógenos. Esta condição pode ter desencadeado uma maior produção de inibidor a fim de elevar a proteção do vegetal.

Dentre as variedades consideradas em condições normais durante a coleta, as que apresentaram maior taxa de inibição foram Vermelha ornamental e Verde asselvajada.

A variedade Vermelha ornamental entretanto, foi a de coloração vermelha testada além da já citada IAC 80 Vermelha e para que uma relação entre a coloração e presença de inibidores possa ser feita, mais testes devem ser realizados. A cultivar Verde asselvajada, assim denominada por ser uma planta coletada fora dos campos de cultivo, pode ter apresentado tal inibição por se tratar de uma planta mais selvagem que as demais.

As miliunidades de tripsina inibida encontradas para os variedades mostraram resultados variantes. Os resultados nos quais a inibição de tripsina foi semelhante nos extratos de mamona fervido e não fervido sugere a presença de inibidor estável ao calor; as inibições nas quais a fervura provocou uma diminuição na inibição, sugere a presença de dois inibidores; um resistente e outro não resistente ao calor. O aumento da inibição com a fervura também foi observado em algumas variedades e embora este resultado seja inesperado, pode-se sugerir a ausência do inibidor termolábil.

A estabilidade térmica dos inibidores de proteases depende de seu peso molecular e do grau de estabilização da conformação ativa por pontes de

dissulfeto (Belitz & Grosch, 1988). O inibidor de Bowman-Birk da soja é mais estável ao calor e às variações do pH do que o inibidor de Kunitz, devido às diferenças de tamanho e número de ligações dissulfeto (Sgarbieri & Whitaker, 1982).

4 CONCLUSÕES

Inibidores de tripsina estão presentes também em Euphobiaceae.

A inibição pode variar entre 20 e 75% dependendo da idade e condições da planta.

O inibidor de tripsina presente em *Ricinus communis* aparenta ser resistente à temperatura de 100 °C por cinco minutos, embora possa se observar em alguns casos a queda na inibição

5 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BELITZ, H.; GROSCH, W. leguminosas. In: _____. **Química de los alimentos**. Madrid : Acribia, 1988. Cap 16, p. 585-598.

BENDER, A. E. Effects on nutritional balance: antinutrients. In: WATSON, D.H. **Natural toxicants in food: progress and prospects**. London: Ellis Horwood International Publishers, 1987. p. 110-124.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **Journal of Genetical Physiology**, New York, v. 30, p. 291-310, 1947

LASKOWSKY, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 49, p. 593-626, 1980.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p. 31-67, Jan. 1994.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**, Oxford, v. 5, p. 259-305, 1991.

SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, New York, v. 28, p. 93-166, 1982.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In: CHEEK, P. R. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton : CRC Press, 1989. v. 3, p. 1-27.

**CAPÍTULO 4 PROSPECÇÃO DE GENES DO TIPO INIBIDOR DE
TRIPSINA DE *Ricinus communis* L.**

RESUMO

PIMENTA, Maiana Reis. **Prospecção de genes do tipo inibidor de Tripsina de *Ricinus communis* L.** 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O ataque de pragas é motivo de grandes perdas na produção agrícola. A aplicação de inseticidas tem sido feita para controlar os ataques, no entanto, seu uso contínuo tem sido responsável pela resistência apresentada por certos insetos. Alternativamente ao uso de agrotóxicos estão sendo desenvolvidas plantas geneticamente modificadas resistentes à pragas específicas através do uso de “genes inseticidas” que codificam para um inibidor de proteases presente no tubo digestivo do predador em questão, impedindo a perfeita ação desta protease durante a alimentação e conseqüente prejuízo na absorção de nutrientes, podendo levar à morte. Larvas de *E. ello* se alimentam de plantas pertencentes à família Euphorbiaceae, no entanto *R. communis* não é atacada, provavelmente devido à presença deste inibidor em suas folhas. Já a cultura da mandioca, amplamente difundida nos países tropicais e cultivada em praticamente em todo o território nacional, tem como um de seus principais predadores a larva de *E. ello*. Com o intuito de isolar genes do tipo inibidor de tripsina, primers específicos para genes de inibidores de tripsina dos tipos Kunitz e Bowman-Birk foram desenhados com base em alinhamento múltiplo de seqüências disponíveis no banco de dados do NCBI. Estes primers foram utilizados na amplificação do gene por PCR. Dos três primers utilizados para cada tipo de inibidor, apenas dois deles apresentaram resultados satisfatórios; o primer denominado 01, desenhado para anelar no início do gene e o denominado 03, desenhado para anelar no final do gene. As amplificações destes dois primers para os dois tipos de inibidores geraram bandas com o tamanho em pares de bases esperado, a partir deste resultado foi possível supor a presença destes inibidores no genoma de *Ricinus communis*. As bandas obtidas devem ser, entretanto, eluídas e seqüenciadas para que a comprovação definitiva possa ser feita.

Comitê orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (orientador), Antônio Chalfun Júnior (UFLA), Magnólia de Araújo Campos (UFLA).

ABSTRACT

PIMENTA, Maiana Reis. **Prospection of genes from inhibitor type of *Ricinus communis* L. tripsin.** Lavras, UFLA 2006 72 p. (Dissertation Master in Plant Physiology).

The pest attack cause large losses in agricultural production, the application of insecticides has been made to controle these attacks, although, its continuous use has been responsible by resistance showed by determined insects. Alternatively the agrototoxic use are being developed by genetically modified plants resistant to specific pest by using “inseticide genes” that codify for a protease inhibitor present in the digestive tube of the considered predator, avoiding in the this way the perfect action of this protease during the feeding and consequently the decrease in nutrient uptake, could cause the death. *E. ello* larvae feed from plants belonging to Euphorbiaceae family, although *R. communis* is not attacked, probably due the inhibitor presence in its leaves. For the manihot crop, that is broad difunded in tropical countries and pratically cultivated in all brasilian territory, and have as one of the main larvae predator the *E. ello*. Aiming to isolate genes from tripsin onhibitor type, specific primers for Kunitz and Bowman-Birk type were designed based in multiple alignment sequence available NCBI data banck. These primers were used in gene amplification by PCR. From three primers used for each inhibitor, only two of them showed satisfactory results, the primer denominated 01, design to anneal in the beginning of the gene and the other 03, designed to anneal in the end of the gene. The amplifications of these two primers for the two types of inhibitors generated bands with the expected size in base pairs in the genome, so based in these results it is possible to suggest the presence of these inhibitors in the genome of *Ricinus communis*, the obtained bands can be eluted and sequenced to get the definitive result.

[†] Guidance committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Major professor), Antônio Chalfun Júnior (UFLA), Magnólia de Araújo Campos (UFLA).

CAPÍTULO 4 PROSPECÇÃO DE GENES DO TIPO INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Ricinus communis* L.

1 INTRODUÇÃO

Grande parte da produção agrícola mundial é perdida devido ao ataque de pragas. A fim de minimizar tais perdas, as aplicações de inseticidas químicos têm sido necessárias. No entanto, esta estratégia tem levado à resistência das populações de insetos aos pesticidas, além de causar contaminação de lençóis freáticos e danos severos ao meio ambiente. Uma alternativa ao uso dos agrotóxicos é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, que são resistentes a pragas específicas. Desta forma, o uso de genes inseticidas provenientes de diversas origens, como bactérias ou plantas, deve ser considerado (Ghoshal, 2004)

Naturalmente as plantas podem se proteger sintetizando macromoléculas específicas como os inibidores de proteases, que inibem irreversivelmente a ação de enzimas digestivas animais, sendo por isso, consideradas antinutricionais.

O primeiro local de ação dos inibidores de proteases é o sistema digestivo da larva do inseto. São geralmente específicos para uma particular classe de insetos, como Lepidópteros, dípteros ou coleópteros, que utilizam proteases serínicas e cisteínicas para degradar as proteínas ingeridas.

Em plantas, os papéis fisiológicos mais importantes destas proteases são: (1) reguladores dos níveis de proteinases endógenas durante a germinação de sementes para digestão de proteínas de armazenamento; (2) proteção contra ataque de insetos; (3) estabilização protéica durante a fase de desenvolvimento da semente e (4) modulação da apoptose (morte celular programada) durante o ataque de insetos (Ussuf, 2001).

Mais de dez famílias de inibidores de tripsina originários de plantas foram identificadas (Deshimaru, 2003), incluindo a família do tipo Kunitz, com

peso molecular de aproximadamente 20 kDa e a família do tipo Bowman-Birk com 8 kDa.

Inibidores do tipo Kunitz podem se ligar apenas à tripsina por possuírem sítio reativo único. Os inibidores do tipo Bowman-Birk, por sua vez, são caracterizados por possuírem dois sítios reativos, que interagem simultaneamente com duas moléculas de proteases, não necessariamente idênticas, inibindo duas enzimas ao mesmo tempo, além de apresentar sete pontes dissulfídicas, o que resulta em uma molécula compacta e resistente (Deshimaru, 2002; Deshimaru, 2004).

A reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica utilizada para a amplificação de ácidos nucleicos específicos. Primeiramente o DNA alvo é desnaturado, em seguida os *primers* são anelados às suas cadeias e finalmente uma nova fita de DNA é polimerizada.

Inúmeras seqüências de genes que codificam inibidores de diversas fontes estão depositadas em bancos de dados públicos, como o NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas seqüências disponíveis representam uma ferramenta básica para estudos comparativos da estrutura dos genes e identificação de regiões conservadas dentro das regiões codantes.

A partir de seqüências de genes conhecidos é possível desenhar primers para clonagem de genes homólogos a partir de plantas.

Ricinus communis representa uma fonte promissora para o isolamento de genes de inibidores de proteases, uma vez que *Erinnyis ello* não se alimenta de suas folhas. A resistência de *Erinnyis ello* tem sua importância na aplicação em variedades susceptíveis a essa praga, como a mandioca, amplamente difundida nos países tropicais.

Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram:

Desenhar primers específicos de inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk através de seqüências depositadas no banco de dados NCBI

Realizar a prospecção dos genes inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho de primers

Primers para amplificar seqüências de inibidores do tipo Bowman-Birk foram desenhados, utilizando-se as seguintes etapas: a) busca dos genes homólogos em banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); b) alinhamento múltiplo das seqüências de DNA e de proteínas (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>); c) predição da seqüência de peptídeo sinal para a identificação do início da região madura (<http://www.expasy.org/>) e d) desenho dos primers propriamente dito com auxílio do programa Genamics Expression (<http://genamics.com/expression/index.htm>).

2.2 Condições térmicas de reações em cadeia de polimerase (PCR)

As reações foram desenvolvidas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), num volume de 20 µL contendo tampão da enzima 1X; 1.5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,5 µM de primer forward; 0,5 µM de primer reverse; 0.4 µL de Taq polimerase .

As reações de amplificação foram realizadas, com desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, seguidos por desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 45 ° C por 45 segundos, e extensão a 72° C por 2 minutos. Os passos de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 35 vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão a 72° C por 5 minutos.

Para a visualização do DNA amplificado foi utilizado gel de agarose 1 % (m/v) corado com 1 μ L de brometo de etídeo (0,01 %) em eletroforese a 70 V em tampão TAE (0.001 mol/L EDTA pH 8,0; 0.04 mol/L TRIS pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi fotografado pelo equipamento EDAS 290 (Kodak).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise estrutural de genes inibidores de tripsina e desenho de primers

Foi proposta a busca de seqüências para inibidores de tripsina do tipo Kunitz e Bowman-Birk em *Ricinus communis*, entretanto, não foram encontradas seqüências referentes a estas proteinases na espécie pesquisada.

Tal resultado era esperado, visto que não foram encontrados até o momento relatos, na bibliografia, de estudos feitos com inibidores de proteases na referida espécie. Foram selecionadas seqüências de inibidores de proteases de plantas mais próximas possível da família Euphorbiaceae.

Na tabela 09, são apresentadas as seqüências utilizadas para o desenho dos primers.

Tabela 09: Identificação das seqüências utilizadas no alinhamento para desenho dos primers

Gene	Nº de acesso	Identificação
Kunitz (KTI)	AF349443	Populus tremuloides Kunitz trypsin inhibitor TI3 mRNA, complete cds
	X15516	Populus trichocarpa wound responsive gwin3 gene
	AY378088	Populus balsamifera subsp. Trichocarpa x Populus deltoides Kunitz trypsin inhibitor 3 (PtdTI3) mRNA, complete cds
	AB081323	Populus nigra PnTIH1.1 gene for trypsin inhibitor homolog, complete cds
Bowman- Birk (BBI)	AY049045	Phaseolus lunatus clone pLBI-1 double-headed Bowman-Birk inhibitor gene, partial cds
	AY049042	Dolichos biflorus clone pHGI-3 double-headed Bowman-Birk inhibitor gene, partial cds
	AJ609422	Phaseolus vulgaris partial bbi gene for double-headed trypsin inhibitor, exon 1, clone pPhv14-15
	AY049044	Phaseolus vulgaris clone pFBI-1 double-headed Bowman-Birk inhibitor gene, partial cds
	AY049047	Dolichos lablab clone pDLT-1 double-headed Bowman-Birk inhibitor gene, partial cds.
	AY049043	Vigna mungo clone pBGI-2 double-headed Bowman-Birk inhibitor gene, partial cds.

Inibidores de proteinases fazem parte de famílias multigênicas no genoma de plantas, possuem regiões codantes, podem variar em genes inibidores de tripsina do tipo Kunitz entre 600 e 612 pb, enquanto que os do tipo Bowman-Birk variam de 309 a 312 pb.

Ambos os inibidores de proteases possuem peptídeo sinal de exportação pelo retículo endoplasmático com tamanho de 159 pb para inibidores do tipo Bowman-Birk e 171 pb para inibidores do tipo Kunitz conforme predição feita usando-se o software signalP (www.expasy.org).

Foi realizado o alinhamento com seqüências protéicas e nucleotídicas (dados não mostrados) (Figuras 06 e 07).

```

X15516 MKITKFLGLSFLFLFAFAATS-FPDGVHAEDPAAVLDFYGREVQAGASYLIDQE-DFRVVN 58
AB081323 MKITKFLGLSFLFLFAFAATS-FPEGVHAEDPAAVLDFYGREVQAGASYLIDQE-DIRVVN 58
AF349443 MKISNFLVLSFLFLFAFTATSIFPRAVHA--AVVIDAFGDEVKAGDRYVIGAASNDFAIT 57
AY378088 MKITNFLVLSFLFLFAFTATSIFPRAVHAE--AVVIDAFGDEVRTGGRYIIAASNDFAVT 57
***:.* *****:***:* .*** .:* :* **:* *:* :.:.

X15516 ATINPICNSDVILSTGIEGLPVTFSPVINSTDGVIREGLITVVSFDASTCGMAGVTPMWK 118
AB081323 ATINPICNSDVILSTGNEGLPVTFSPVINSTDGVIREGLITVVSFDASTCRMAGVTPMWK 118
AF349443 ATSPIICNSDVVFSPMSDGLPVIFSKVVESENDSVINEDSYLNVDFDAPSCRMAGVSTMWK 117
AY378088 S-SRIICNSDVFLSPMSNGLPVIFSPVVESENDSVIHEDSNLNVDFDAATCRMAGVSTMWK 116
: *****:*. :***** ** *:*.*.*.*.: :*.***:.* *****:.*

X15516 IGFNSTAGYIVTTGGVDRNLNLFKIKTFESDSSFYQLSYCPNSEPFCECPCVPVGANSK 178
AB081323 IGFNSTAGYIVTTGGVDRNLNRFKIKTYEGDSSFYQLSYCPNSEPFCECPCVPVGANSK 178
AF349443 IELRLTARGFVVTTGGVAGLNRFITIKYEGGTNQYQLSYCPISEPICECSCVPLGNVNR 177
AY378088 IELRPTARGFVVTTGGVAGLNRFIXIKYEGGNLYQLSYCPISEPICECSCVPLGKVVNR 176
* :. **:*:***** ** * **:*.*... ***** **:*.*.*.* **:* :.

X15516 YLAPNVSYADFRFKP--DARIEST-- 200
AB081323 YLAPNVSYADFRFKP--VARIEST-- 200
AF349443 -LAPSTVPPFVVFIPSDRASKIEYKMM 203
AY378088 -LAPSTVPPFVVFVPSDRASKIEYKMM 202
***. . * * ::** .:

```

Figura 06 : Alinhamento das seqüências protéicas de inibidores de tripsina do tipo Kunitz. A região marcada em cinza representa a seqüência do peptídeo sinal predita pelo programa signal-P

```

AJ609422 MVVLKVCVLLFLLGSSTASLKLSELGLLMKSGHRHESTDEPSESSKACCDHCACTKSIP 60
AY049044 MVVLKVCVLLFLLGSSTASLKLSELGLLMKSGHHHESTDEPSESSKACCDHCACTKSIP 60
AY049045 MVVLKVCVLLFLLGTSTASLKLSELGLLMKSGHHHESTDEPSESSKPCCDHCACTKSIP 60
AY049042 MVVLKVCFMLLFLGTSTASLRLESELGILIKNDH-HQSTDEPSESSKPCCDQCACTKSIP 59
AY049047 MVVLKVCFMLLFLGTSTASLRMSELGLRFKSGH-HQSTDEPSESSKPCCDHCACTKSIP 59
AY049043 MVVLKVCMLLFLGTCAASLKQSELEQLIKSGRRHESTDEPSESSKPCCDQCACTKSIP 60
*****:*****:****: ** * :*.: *:******.***:*****

AJ609422 PQCRCDLRLNSCHSECKSCICTFSIPAQCVCCTDINDFCYEPCK 104
AY049044 PQCRCDLRLNSCHSECKSCICTLSIPAQCVCCTDINDFCYEPCK 104
AY049045 PQCRCTDLRLDSCHSACKSCICTLSIPAQCVCNDINDFCYEPCK 104
AY049042 PQCRCTDLRLNSCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVDMKDFCYEPCK 103
AY049047 PQCHCDLRLNSCHSACKPCLCTFSIPAQCVCADTINDFCYEPCK 103
AY049043 PKCRCDLRLNSCHSACKSCACTYSIPAQCVCADINDFCYEPCK 104
**:*:**:*:**:*:** *.* ** ***** ** * :*****

```

Figura 07: Alinhamento das seqüências protéicas de inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk. A região marcada em cinza representa a seqüência do peptídeo sinal predita pelo programa signal-P

O alinhamento múltiplo dos genes de inibidores de proteases do tipo Kunitz e Bowman-Birk apresenta alta homologia entre as espécies analisadas. Tal homologia é, entretanto, menor quando se observa o alinhamento de seqüências nucleotídicas.

Este resultado demonstra grande homologia entre as espécies alinhadas no que diz respeito a inibidores de tripsina, favorecendo o sucesso no desenho dos primers, no entanto, deve-se considerar a elevada taxa de mutação que pode ocorrer entre famílias de plantas e que não foi utilizada para o alinhamento nenhuma seqüência da família Euphorbiaceae.

As seqüências dos primers desenhados para BBI e KTI estão descritas na Tabela 10. A posição de anelamento dos primers nas seqüências dos genes, bem como os tamanhos de produtos de PCR esperados, estão demonstrados na figura 8.

Sítios de restrições para as enzimas *BamH I* e *Hind III* foram adicionados aos primers visando facilitar a posterior clonagem em vetor de expressão pQE 30 em *E. coli*.

Tabela 10: Seqüências dos primers desenhados com as caudas das enzimas de restrição utilizadas

Identificação	Primer (5' → 3')	
	Sítio de restrição	Seqüência específica de IP
BBI 01	<i>BamH I</i> CGC GGA TCC	ATG GTG GTG CTA AAG GTG TG
BBI 02	<i>BamH I</i> CGC GGA TCC	AGT TTG AAG CTG TCT GAG
BBI 03	<i>Hind III</i> CCC AAG CTT	TTT GCA AGG TTC GTA GCA G
KTI 01	<i>BamH I</i> CGC GGA TCC	ATG AAG ATC ACT AAC TTT C
KTI 02	<i>BamH I</i> CGC GGA TCC	GCA GCA GTG CTC GAT TTC T
KTI 03	<i>Hind III</i> CCC AAG CTT	GCC AAC TGG GAC GCA TGA G

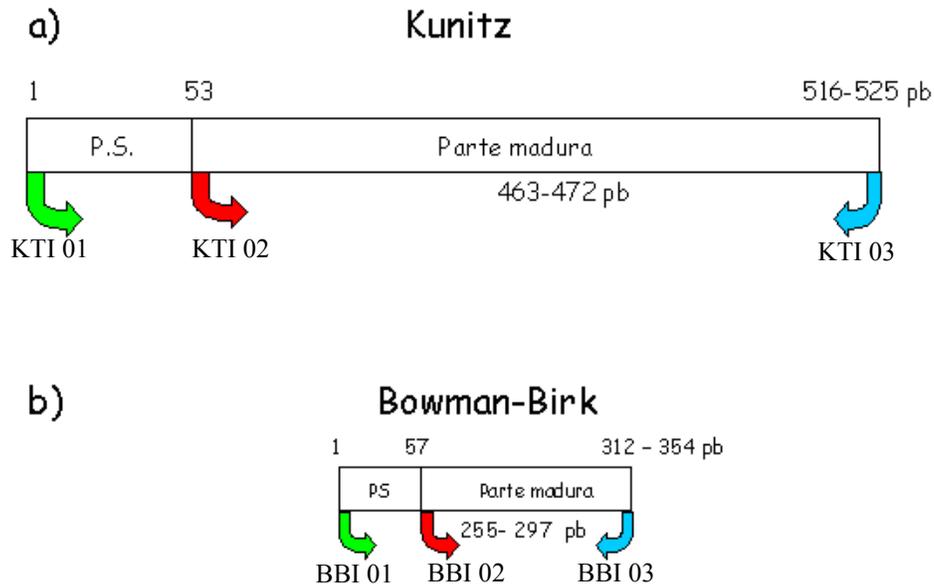


Figura 8: (a) Esquema do gene inibidor de tripsina do tipo Kunitz (b) Esquema do gene inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk. As setas representam os locais de anelamento dos primers desenhados. PS= Peptídeo sinal; KTI= Kunitz tripsin inhibitor; BBI= Bowman-Birk inhibitor

Uma vez desenhada, a seqüência dos primers foi colocada no programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), que procura seqüências de genes com homologia à seqüência que se deseja analisar (query). Os resultados obtidos foram de encontro com o esperado, uma vez que todos os primers desenhados tiveram homologia com genes de inibidores de tripsina.

3.2 Amplificação via PCR

O tamanho de bandas esperado em Kunitz e Bowman-Birk quando utilizados os pares de primers 01-03 e 02-03 pode ser analisado na figura 08.

Para kunitz, o tamanho em pares de bases esperados com a amplificação dos primers KTI 01 e KTI 03 é de 525 pb, a amplificação dos primers KTI 02 e

KTI 03 deve resultar em um fragmento de 472 pb. Para Bowman-Birk, os tamanhos esperados são 354 pb e 297 pb, respectivamente. As condições de preparo da PCR descritas conforme item 2.2 são visualizadas em gel de agarose 1 % (1 g de agarose + 100 mL TAE) + 1 μ L brometo de etídio 0,1 % (Figura 09).

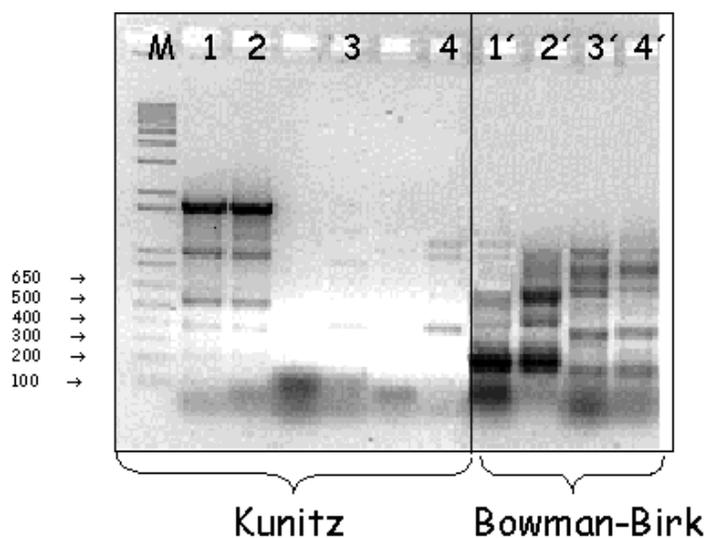


Figura 09: Gel de agarose 1% mostrando resultado da amplificação de PRC utilizando primers específicos para genes inibidores de tripsina do tipo Kunitz KTI e Bowman-Birk BBI. M= marcador 1Kb ladder. Canaletas 1 e 2 - Primers KTI 1 e KTI 3; canaletas 3 e 4 primers KTI 2 e KTI 3; canaletas 1' e 2' BBI 1 e BBI 3 canaletas 2' e 4' BBI 2 e BBI 3.

O resultado da amplificação dos primers KTI 01 e KTI 03 demonstrou uma banda de tamanho aproximado ao esperado (Figura 07), o mesmo pode ser observado para o par de primers BBI 01 e BBI 03.

A banda esperada referente à amplificação com o par de primers KTI e BBI 02 e 03 não pode ser claramente observada (Figura 09).

Este resultado pode indicar a ausência de inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk no genoma de *Ricinus communis*, hipótese pouco provável, ou à ineficácia do primer desenhado.

A ineficiência do primer pode ser devido ao seu desenho, uma vez que se tomou como base seqüências de organismos distantes filogeneticamente de mamona presentes em bancos de dados, ou ainda devido à otimização do protocolo de PCR, que pode estar desfavorecendo o anelamento do primer 2 tanto de KTI como de BBI.

4 CONCLUSÃO

O par de primers KTI 01 e KTI 03 foi capaz de amplificar o que parece ser o gene completo do inibidor do tipo Kunitz, assim como o par BBI 01 e BBI 03 para Bowman-Birk.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DESHIMARU, M.; HANAMOTO, R.; KUSANO, C.; YOSHIMI, S.; TERADA, S. Purification and Characterization of Proteinase Inhibitors from Wild Soja (*Glycine soja*) Seeds. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, n. 9, p. 1897-1903, Sept. 2002

DESHIMARU, M.; WATANABE, A.; SUEMATSU, K.; HATANO, M.; TERADA, S.; Purification, amino acid sequence, and cDNA cloning of trypsin inhibitors from Onion (*Allium cepa* L.) Bulbs. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, n. 8, p. 1653-1659, Aug. 2003

DESHIMARU, M.; YOSHIMI, S.; SHIOL, S.; TERADA, S. Multigene Family for Bowman-Birk Type Proteinase Inhibitors of Wild Soja and Soybean: The Presence of Two BBI-A Genes and Pseudogenes. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 6, p. 1279-1286, June 2004.

EMBL-EBI European Bioinformatics Institute <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>> acesso em de 2006

ExPASy Proteomic Server – SignalP - Prediction of signal peptide cleavage sites <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>> acesso em 2006

GHOSHAL, D.; SEN, S. K.; GOYAL A. Introduction and Expression of Cowpea Trypsin Inhibitor (CpTI) Gene in Transgenic Tobacco. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, New Delhi, v. 10, n. 1, p. 19-24, Jan. 2001

NCBI - National Center of Biotechnology Information <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> acesso em 2006

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> acesso em 2006

USSUF, K. K.; LAXMI, N. H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants **Current Science, Bangalore**, v. 80, n.7, p. 847-853, Apr. 2001.