



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica

**MARIA ANGÉLICA GAAG DUARTE GRAZZIOTIN**

**INTRODUÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE DA ARCELINA DO FEIJÃO COMUM  
(*Phaseolus vulgaris* L.) EM FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] PARA  
RESISTÊNCIA AOS CARUNCHOS *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus  
maculatus***

**Orientador: Francisco José Lima Aragão**

**Brasília –DF  
2016**

**MARIA ANGÉLICA GAAG DUARTE GRAZZIOTIN**

**INTRODUÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE DA ARCELINA DO FEIJÃO COMUM  
(*Phaseolus vulgaris* L.) EM FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] PARA  
RESISTÊNCIA AOS CARUNCHOS *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus  
maculatus***

**Orientador: Francisco José Lima Aragão**

**Brasília –DF  
2016**

Tese de autoria da aluna Maria Angélica Gaag Duarte Grazziotin, intitulada “Introdução e expressão do gene da Arcelina do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] para resistência aos carunchos *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*”, realizada junto ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Dr. Francisco José Lima Aragão, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF)

Aprovado por:

---

Dr. Francisco José Lima Aragão (Orientador)

---

Dr. Nicolau Brito da Cunha. Universidade Católica de Brasília – UCB.

---

Dr. Josias Correa de Faria. EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão.

---

Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

---

Dra. Andréa Rachel Ramos Cruz Souza.

---

Dra. Sarah Cristina Caldas Oliveira.

## AGRADECIMENTO

Agradeço ao professor Dr. Francisco Aragão por ter me recebido no seu laboratório e me deixar realizar o sonho de fazer doutorado ao lado de alguém que eu admiro e em quem posso me inspirar;

Agradeço a Elsa Nogueira pela sua paciência, boa vontade e incentivo em todos os momentos no laboratório;

A Dra. Glaucia Cabral pelo apoio e pelos ensinamentos;

Aos meus colegas de trabalho, agradeço de todo coração. Foi muito importante estar ao lado de vocês neste período.

Aos que já partiram para outras jornadas, Abdul, Nay, Lorena, Cristiana Andrade e Cristina. E aos amigos que se encontram presentes, Pedro, Natália, Tomas, Thais, Tatiane, Jéssica, Lídia, Cris Citadin, Aline, Estela, alunos do Laboratório de Engenharia Genética voltada à Agricultura (LEG) e Lílian e Luciana (APOMIXIA);

Ao Dr. Luís Palhares que me auxiliou nas análises estatísticas deste trabalho;

Agradeço em especial à presença, apoio e carinho da Franciele Maldaner, a quem admiro como profissional e principalmente, como ser humano;

Aos amigos recentes e que já fazem parte da minha vida, Renato e Raquel;

Dra. Francesca Sparvoli (*Italian National Research Council*) pela colaboração;

Dra. Eliane Quintela (Embrapa Arroz e Feijão – GO) por ter cedido o material animal utilizado neste trabalho, bem como pelo treinamento para a realização dos bioensaios e para a manutenção dos insetos ao longo das gerações.

E à CAPES, pelo incentivo financeiro durante esta jornada;

Em especial, ao meu esposo que me apoia em todos os momentos da minha vida, e a minha família, que mesmo distante se mostra presente quando mais preciso.

Dedico esta tese a minha avó amada, Augina Soares Gaag,

E à querida amiga Maria Laine Penha Tinoco.

*“ Viver nos corações que ficam é não morrer”*

Harold Robbins

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Características Do Feijão-Caupi – <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp .....	14
2.2 Importância Agroeconômica .....	15
2.3 Principais Fatores Que Prejudicam A Produção Do Feijão-Caupi.....	16
2.4 Aspectos Biológicos do <i>Zabrotessubfasciatus</i> (Boheman, 1833).....	16
2.5 Aspectos Biológicos do <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius, 1775).....	19
2.6 Lectinas .....	20
2.7 Variantes Do Gene Da Arcelina .....	22
2.8 Estrutura Da Proteína Arcelina-1 .....	24
2.9 Atividade Inseticida Da Proteína Arcelina.....	25
3 JUSTIFICATIVA .....	28
4 HIPÓTESE .....	29
5 OBJETIVO GERAL.....	30
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
6 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
6.1 Material vegetal.....	31
6.2 Criação de insetos.....	31
6.3 Extração de DNA genômico do feijão Arc100.....	31
6.4 Detecção do gene da Arcelina no feijão Arc100.....	31
6.5 Análise <i>in silico</i> .....	32
6.6 Construção de vetor para transformação por biobalística.....	32
6.7 Transformação do feijão-caupi por biobalística (IVO <i>et al.</i> , 2008).....	33
6.8 Aclimação .....	34
6.9 Desenho dos iniciadores específicos ( <i>primers</i> ) .....	34
6.10 Detecção do gene da <i>Arcelina</i> nas plantas transformadas por PCR.....	34
6.11 Detecção do gene <i>Ahas</i> por PCR.....	35
6.12 Bioensaio (protocolo fornecido pela Embrapa Arroz e Feijão- GO).....	35
6.13 <i>Western blot</i> (Brasileiro e Carneiro, 1998).....	36
6.14 Dot blot (Brasileiro e Carneiro, 1998).....	36

6.15 Ensaio imunológico por ELISA indireto (Brasileiro e Carneiro, 1998).....	37
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
7.1 Transformação Genética .....	38
7.2 Confirmação Plantas GM Da Variedade BRS Imponente.....	40
7.3 Confirmação Plantas GM - Feijão Bocanegra ( <i>Black-eyed peas</i> ) .....	42
7.4 Detecção Por Dot Blot Da Presença Da Proteína Arcelina Em Plantas Transformadas .....	43
7.5 Detecção Da Proteína Arcelina Por <i>Western Blot</i> .....	45
7.6 Resultado Da Análise Das Sementes Por Elisa Indireto .....	47
7.7 Análises Das Sementes Utilizadas Nos Bioensaios.....	48
7.8 Bioensaio Com <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	49
7.9 Bioensaio com <i>Zabrotes subfasciatus</i> .....	56
8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	63
REFERÊNCIAS .....	65

## TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1. Fêmea <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman, 1833).....	17
Figura 2. Ovos do <i>Zabrotes subfasciatus</i> fixos ao tegumento do <i>Phaseolus vulgaris</i> por meio de uma secreção adesiva .....	18
Figura 3. <i>Zabrotes subfasciatus</i> galerias formadas após a saída dos insetos adultos do feijão-caupi .....	18
Figura 4. Macho e fêmea <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	19
Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas clonadas que codificam as variantes da arcelina.....	23
Figura 6. Sequência dos aminoácidos da proteína Arcelin-1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ].....	24
Figura 7. Estrutura 3D da proteína arcelina.. .....	24
Figura 8. Proteína Arcelin-1 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ). .....	25
Figura 9. Sementes artificiais contendo teores crescentes da proteína arcelina utilizadas em bioensaio com <i>C. maculatus</i> (JANARTHANAN; SURESH, 2010) .....	26
Figura 10. Mapa circular do vetor G853123-1 pAHAS-arc1. ....	33
Figura 11. Etapas da transformação do feijão-caupi .....	40
Figura 12. Análise das plantas transformadas da variedade BRS Imponente. ....	41
Figura 13. Análise por PCR da presença do gene da <i>Arcelina</i> na geração T <sub>0</sub> da linhagem Bocanegra (511 pb). .....	43
Figura 14. Análise da presença da proteína por Dot blot. ....	44
Figura 15. Análise da expressão das proteínas por <i>Western blot</i> .....	46
Figura 16. Análise das proteínas expressas na linhagem 3. ....	46
Figura 17. Análise das linhagens transgênicas e do controle negativo por ELISA indireto... ..	47
Figura 18. Análise das sementes da geração T <sub>4</sub> da Linhagem 5 para presença do gene da <i>Arcelina</i> .....	48
Figura 19. Emergência média de gerações dos <i>C. maculatus</i> ao longo dos bioensaios. ....	52
Figura 20. Perda média da massa dos grãos nos cinco bioensaios após a emergência de gerações dos <i>C. maculatus</i> ao longo dos bioensaios.....	54
Figura 21. Adulto e larvas do <i>Callosobruchus maculatus</i> no quinto bioensaio do tratamento L5. S .....	55
Figura 22. Oviposição do <i>Z. subfasciatus</i> nos bioensaios.....	56
Figura 23. Emergência média dos <i>Z. subfasciatus</i> . ao longo dos bioensaios no controle e no tratamento com as linhagens transgênicas 5 e 3. ....	58
Figura 24. Perda média da massa dos grãos nos cinco bioensaios. ....	60
Figura 25. Sementes infestadas pelo <i>Z. subfasciatus</i> . .....	62
Tabela 1- Dados da transformação do feijão-caupi da variedade BRS Imponente e da linhagem Bocanegra (Black-eyed peas).....	39

## LISTA DE ABREVIACOES

APA – Arcelina/ fitohemaglutinina / inibidor da  $\alpha$ -amilase

Arc- Arcelina

ARL - *arcelin-like*

BAP - 6-benzilaminopurina

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CG - Circle Grow

CPSMV - *Cowpea severe mosaic virus*

ELISA - Ensaio por Enzimas Imuno-adsorvidas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

GenBank - National Center for Biotechnology Information

KD – kilodaltons

MS - Murashige-Skoog-Medium

NCBI - National Center for Biotechnology Information

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Pb- Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PHA - Fitohemaglutinina

pNPP – p-Nitrofenil

RNAi – RNA interferente

SCOP -Classificação Estrutural da Proteína

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

TIGR - Plant Transcript Assemblies

*V. unguiculata* – *Vigna unguiculata*

$\alpha$ AI - Inibidor da  $\alpha$ -amilase

## RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa de importância agroeconômica para o Brasil, sendo plantado principalmente nos estados do Norte e Nordeste. Esse feijão quando armazenado pode ser infestado por dois bruquídeos, o *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) e o *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775). No intuito de diminuir as perdas pela infestação desses bruquídeos, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de uma metodologia que seja uma alternativa ao uso de métodos químicos convencionais para o controle dessas pragas. No México foram identificados altos níveis de resistência aos bruquídeos em genótipos silvestres do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e que estavam relacionados uma classe particular de proteínas de reserva de sementes, conhecidas como arcelinas. Neste trabalho, o gene *Arcelina-1* foi introduzido por biobalística em eixos embrionários de sementes do feijão-caupi no intuito de ocasionar um fenótipo similar. Duas linhagens transgênicas contendo o gene da *Arcelina-1*, denominadas L5 e L3, foram utilizadas para desafiar duas espécies de bruquídeos, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*. No bioensaio, o *Z. subfasciatus* mostrou ser sensível à presença da proteína arcelina-1 nas sementes, em ambas linhagens transgênicas, tendo como resultado a diminuição da população ao longo das gerações. O *C. maculatus* mostrou ser resistente à presença da proteína, principalmente na L3, mesmo tendo esta linhagem apresentado uma concentração maior da proteína, como observado por análises de *Western blot*, *Dot blot* e Elisa indireto. Apesar de apresentar efeito biocida quando expressa na semente, arcelina-1 mostrou ter uma diminuição lenta do *Z. subfasciatus* ao longo das gerações, sendo necessárias quatro gerações para se obter um controle biológico desse bruquídeo. Desta forma, torna-se interessante buscar novas alternativas para o controle desses carunchos, como pela introdução de genes mais promissores no feijão-caupi, como *Arc4* ou *Arc8*, os quais mostraram apresentar um efeito biocida em duas espécies de caruncho, o *Acanthoscelides obtectus* (Say) e *Z. subfasciatus*, aumentando a chance de se obter uma diminuição desses bruquídeos na primeira geração.

**Palavras-chave:** Melhoramento de planta; Genes Relacionados da lectina; Controle biológico.

## ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is an important leguminous crop that is highly cultivated in Brazil, particularly within the North and Northeast regions of the country. Among the factors that hamper with the production potentials of this important crop, post-harvest losses due to attack by *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) and *Callosobruchus maculatus* have been at the forefront. In order to reduce losses caused by these bruchids, the development of alternative methods that do not rely on the use of chemicals becomes necessary. With the discovery of arcelins, a class of reserve proteins in wild genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), which have been shown to confer resistance against bruchids, there is an opportunity to employ transgenic approach to generate cowpea with similar phenotype. Here, *Arceline-1* gene was introduced into cowpea genome through biobalistic method of genetic transformation using embryogenic axes as target tissues, in an attempt to confer resistance against *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* in the crop. Following transformation, selection and regeneration, two events, denominated L5 and L3 were used to challenge the two insect species in a bioassay system. In the case of *Z. subfasciatus*, both lines were protected against the insects as evidenced by decrease in insect population along four generations when expressed by their seeds. However, *C. maculatus* was resistant against the protein, especially in L3. This became apparent with increasing concentrations of the protein isolated from the line and as evidenced by *Western blot*, *Dot blot* and indirect *Elisa* analyses. Although *Arceline-1* protein presented biocidal effect when expressed in cowpea seed, it merely reduced the population of *Z. subfasciatus* gradually and only attained its maximum biological effect by the 4th generation of the insects. The use of alternative gene like *Arc4* and *Arc8*, which have been shown to exhibit biocidal effect in *Acanthoscelides obtectus* (Say) and *Z. subfasciatus*, may complement the attempt made in this work, to further maximize the chance of controlling these bruchids along generations.

Keywords: Plant breeding; Lectin; Lectin-related genes; Biological control.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem se classificado como o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), onde o cultivo desse grão tornou-se popular por todo País. (BALDIN; PEREIRA, 2010; BURLE *et al.*, 2010). O feijão é uma das mais importantes fontes de proteína na dieta brasileira, e em combinação com o arroz, essa cultura torna-se a refeição diária básica para a maioria dos brasileiros (BURLE *et al.*, 2010).

Outra leguminosa presente na alimentação brasileira é o feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp (DIOUF, 2011). O feijão-caupi é produzido principalmente nas regiões Nordeste e Norte do Brasil, tendo importância alimentar, pois é consumido em todas as regiões do Brasil, e importância econômica, sendo uma fonte geradora de renda e emprego principalmente para pequenos agricultores (FILHO *et al.*, 2011).

O feijão-caupi se adapta em solos de baixa fertilidade e nas mais diversas condições de cultivos naturais devido à associação simbiótica com o *Rizóbio* (EHLERS; HALL, 1997; LIMA *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2006; TIMKO *et al.*, 2008).

Quantidades substanciais de feijão comum podem ser perdidas desde o campo até o seu armazenamento em silos metálicos ou galpões devido a infestações pelo bruquídeo mexicano *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) e/ou pelo bruquídeo *Acanthoscelides obtectus* (Say)

O dano provocado pela infestação desses insetos promove a perda da qualidade da semente devido ao aparecimento no interior das sementes de fezes, ovos e larvas desses animais, tornando-o impróprio para o consumo, como também facilita infestação por fungos e grãos por meio das galerias formadas pela saída dos insetos adultos (BARRETO; SANTOS, 2007; KUSOLWA; MYERS, 2011; PAES *et al.*, 2000; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, P; ZUKOVSKI, 2007; SARI; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, 2003; ZAUGG *et al.*, 2013).

Em legumes, as larvas dos insetos infestam as vagens e sementes nas leguminosas para completar sua metamorfose, emergindo da semente somente na fase adulta, quando reinicia seu ciclo de vida em outras vagens e sementes (GROSSI DE SA *et al.*, 1997; MBOGO K.P., DAVIS J., 2009; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009).

Em acessos silvestres do feijão-comum foram encontradas proteínas que conferiam resistência desse feijão as larvas do caruncho *Z. subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* (OSBORN *et al.*, 1988). Essas proteínas conhecidas como arcelinas, fazem parte de um grupo de lectinas e podem ser encontradas naturalmente em grande quantidade em acessos selvagens do feijão-comum, sendo uma alternativa interessante no controle de pragas (LIOI *et al.*, 2003; ZAUGG *et al.*, 2013).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características Do Feijão-Caupi – *Vigna unguiculata* (L.) Walp

*V. unguiculata* é uma planta herbácea, dicotiledônea, diplóide ( $2n = 2x = 22$ ), pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae, gênero *Vigna* e secção Catiang (TIMKO *et al.*, 2008). A sua origem ainda é incerta, porém, acredita-se que seja do oeste da África e tenha sido introduzida no Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, no século XVII (BA *et al.*, 2004).

O feijão-caupi possui ampla distribuição nas regiões tropicais, sendo encontrada nos continentes da África, Ásia e Américas (região pantropical) (DIOUF, 2011).

O feijão-caupi tem uma variedade de nomes vulgares no Brasil, tais como feijão-de-corda, feijão-verde, feijão macassar, feijão-fradinho, feijão-de-praia, feijão-gurutuba ou feijão-trepa-pau e nos Estados Unidos é conhecido como ervilhas do sul (ROCHA *et al.*, 2007; TIMKO *et al.*, 2008).

Essa leguminosa pode ser totalmente aproveitada, desde os grãos até o bagaço, pois possui folhas e ramos que podem ser empregados como complemento na alimentação inseto e sua massa verde pode ser incorporada aos solos e utilizada como adubo verde (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005).

Entre os produtos comerciais importantes do feijão-caupi, podem ser citados: o feijão verde e a semente, que correspondem a quase totalidade do mercado, sendo muito utilizado na culinária brasileira, fazendo parte de produtos como acarajé, bolos, doces, pães e tortas (FILHO *et al.*, 2011; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2002; ZILLI *et al.*, 2006).

Com relação ao seu valor nutricional, essa leguminosa apresenta nos grãos todos os aminoácidos essenciais (treonina, valina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, metionina, triptofano, arginina), além de carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais (fósforo, ferro e zinco), fibras com teor elevado de ácidos graxos insaturados como o ácido linoléico e de ácido graxo saturado como o palmítico (DIOUF, 2011; FATOKUN *et al.*, 2002; FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005; FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008).

Quanto à biologia floral do feijão-caupi, suas flores são tidas como perfeitas, com pistilo e estame na mesma flor, e zigomorfas, com simetria bilateral, sendo ainda considerada evoluída em relação ao seu sistema reprodutivo, porque apresenta ampla autofecundação (autógama), sem deixar de manter a capacidade da polinização cruzada (alogamia), sendo desta forma polígama (ROCHA *et al.*, 2007). A taxa de alogamia no feijão-caupi é considerada baixa, a fecundação cruzada natural é inferior a 1%, podendo variar com o ambiente e o genótipo, o que é importante para manutenção da coleção de cultivares e produção de sementes geneticamente puras (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005).

Os frutos são legumes cilíndricos, retos ou curvados, e a forma da semente pode ser alongada, alongada-reniforme, ovoide ou globosa-angular, ou, às vezes, cilíndricas e elípticas (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005; OLIVEIRA, 2012). A propagação dessa leguminosa é exclusivamente por sementes e a semeadura é direta no campo (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005).

## **2.2 Importância Agroeconômica**

O feijão-caupi possui importância agroeconômica no cenário brasileiro por adaptar-se a diversas regiões do país, com temperaturas elevadas, solos arenosos ou de textura média e com alternância de períodos úmidos e secos, constituindo, assim, uma fonte de consumo e subsistência para populações de baixa renda (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005; FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, P; ZUKOVSKI, 2007).

Entre os componentes da produção, o número de vagens e o número de sementes por vagem, assim como as características morfológicas das sementes, como tamanho e cor, apresentam importância tanto para a tecnologia de sementes, como para a preferência do consumidor no que se refere ao consumo de grãos verdes ou secos (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005). Esse feijão é cultivado com destaque nos estados do Ceará, Bahia e Piauí, no Nordeste; Pará, no Norte; e Mato Grosso no Centro Oeste (SINIMBU, 2014).

Entre 2012/2013, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE., 2014) relata que a produção brasileira de feijão-caupi foi de 303,6 mil toneladas, enquanto na safra de 2013, foram produzidas 280,3 mil toneladas (DAMASCENO, 2015).

### 2.3 Principais Fatores Que Prejudicam A Produção Do Feijão-Caupi

A produtividade do feijão-caupi torna-se baixa devido a alguns fatores abióticos, como a seca e baixa fertilidade do solo, assim como fatores bióticos (MIKLAS *et al.*, 2006). Entre os fatores bióticos destacam-se insetos e nematóides e as doenças causadas por vírus, fungos e bactérias.

O feijão-caupi é suscetível a muitas viroses, podendo estas ser responsáveis por até 70% da perda da safra (DUARTE, 2015; SANTOS *et al.*, 1978). Os vírus mais importantes são: *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) (família *Comoviridae*) e o *Cowpeaaphid-borne mosaic virus* (CABMV) (família *Potyviridae*) (LIMA *et al.*, 2005). Entre os fungos, pode-se citar o que causa a ferrugem (*Uromycesvignae*) no feijão-de-corda (D'SILVA; HEATH, 1997).

Além dos vírus, os nematóides fazem parte dos fatores que diminuem a produtividade do feijão-caupi. O nematóide das galhas (*Meloidogyneincognita*) o qual ataca raízes das plantas, tornando o sistema radicular ineficiente para absorção de nutrientes e água, reduzindo a sua produção (CAETANO *et al.*, 2007).

Na herbivoria incluem-se o ataque por insetos bruquídeos ou carunchos que podem atuar desde o desenvolvimento do grão no campo até o seu armazenamento (Sales *et al.* 2005; Silva *et al.* 1999). O *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) é a principal praga do feijão comum e do feijão-caupi, enquanto que o *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) coloniza somente o feijão-caupi, sendo ambos predadores do feijão armazenado (RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, P; ZUKOVSKI, 2007; SILVA *et al.*, 1999).

### 2.4 Aspectos Biológicos do *Zabrotessubfasciatus* (Boheman, 1833)

O *Z. subfasciatus* (Ordem Coleoptera, Família Bruchinae), também conhecido como caruncho do feijão, é originário das regiões tropicais das Américas Central e do Sul e é considerada uma das principais pragas do feijão (*Phaseolus vulgaris* L (Fabaceae) durante o seu armazenamento (SARI; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, 2003; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009).

A estratégia biológica desses besouros é serem holometábolos fitófagos (alimentam-se dos tecidos vivos das plantas), apresentarem forma globular, medindo aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento, com pernas e antenas longas, élitros

que são asas anteriores engrossadas e endurecidas que servem como proteção, mas que não cobrem totalmente o abdômen, possuem asa posterior por baixo do élitro (SILVA *et al.*, 2013; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2004).

Outra característica encontrada é o fato das fêmeas (Figura 1) serem maiores que os machos e se diferenciarem pelo dicromismo sexual, apresentando élitro pretos e brilhantes com uma mancha branca em cada um, enquanto que os machos possuem coloração marrom-clara (SILVA *et al.*, 2013; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2004).



**Figura 1.** Fêmea *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833). A característica predominante da fêmea é o seu élitro ser escuro e com uma mancha branca de cada lado. Foto internet. Acesso: <<http://www.pestnet.org>>. 2016.

A fêmea oviposita diretamente nas sementes, de maneira randômica, ou nas vagens perfuradas por outro inseto (SILVA *et al.*, 2013; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2004). As fêmeas podem depositar entre 20 a 55 ovos, sendo a média de oviposição de 35 ovos por fêmea e o pico de oviposição no terceiro e quarto dia após a sua emergência (BARBOSA *et al.*, 1999; CORREA *et al.*, 2015; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009). Os ovos arredondados são protegidos por uma substância excretada na hora da postura (Figura 2) para que eles fiquem presos e protegidos ao grão (SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009).



**Figura 2.** Ovos do *Zabrotes subfasciatus* fixos ao tegumento do *Phaseolus vulgaris* por meio de uma secreção adesiva. Fotos do autor. 2016.

Após a eclosão, a larva perfura o tegumento e alimenta-se somente do conteúdo da semente, principalmente do endosperma e do próprio embrião, sendo incapaz de buscar outra fonte de alimento.(SARI; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, 2003; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009).

Nesse local as larvas pupam e após o desenvolvimento completo, formam um orifício na superfície do grão saindo para o exterior, comprometendo as sementes para comercialização ou plantio (SARI; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, 2003; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009). Este dano promove desde a perda de peso das sementes, redução do valor nutritivo até a queda do poder germinativo da semente, podendo ainda facilitar a infestação dos grãos por fungos e principalmente, pela alteração qualitativa do produto (BARRETO; SANTOS, 2007; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, P; ZUKOVSKI, 2007; SARI; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, 2003).

Os adultos emergem do grão após empurrar o opérculo (Figura 3) ou podem permanecer nele por dias (SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009). Uma hora após sair do grão, o macho adulto consegue copular, enquanto as fêmeas começam a ovopositar entre 2 a 30 horas após a cópula na temperatura de 30°C (SARI; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, 2003; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2009).



**Figura 3.** *Zabrotes subfasciatus* galerias formadas após a saída dos insetos adultos do feijão-caupi. Fotos do autor. 2015.

Em relação à temperatura e a umidade, foi observado que em temperaturas baixas a fecundidade do *Z. subfasciatus* é menor conseqüentemente, a oviposição média também é menor (CORREA *et al.*, 2015; HOWE; CURRIE, 1964; SARI; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, 2003). Esse inseto é nativo da América Central, onde a temperatura ideal para a sobrevivência do *Z. subfasciatus* está por volta dos 32°C, sendo seus limites de sobrevivência entre 19°C e 35°C (DECHECCO E.; ORTIZ, 1988; HOWE; CURRIE, 1964). Esse fato está associado à evolução do organismo, que pode ter adquirido traços adaptativos que incluem índice mais baixo de reprodução, desenvolvimento mais lento e mobilidade reduzida (MESQUITA *et al.*, 2007)

As medidas de controle utilizadas para diminuir a infestação por caruncho envolvem a aplicação de inseticidas, o armazenamento em silos metálicos herméticos e a utilização de cultivares resistentes a essas pragas (LAZZARI, 2015).

## 2.5 Aspectos Biológicos do *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775)

O *Callosobruchus maculatus* (Classe: Insecta, Ordem: Coleoptera, Família: Bruchinae) é um parasita de sementes secas, sendo a principal praga do feijão *V. unguiculata* armazenado (COPE; FOX, 2003). Nessa espécie, as fêmeas são maiores do que o macho (Figura 4) e, como no caso do *Z. subfasciatus*, as fêmeas postam seus ovos na superfície das sementes e as larvas se desenvolvem dentro das sementes onde se alimentam, empupam até a fase adulta (MARSARO; VILARINHO, 2011; SAVALLI; FOX, 1999).



**Figura 4.** Macho e fêmea *Callosobruchus maculatus*. O macho, a esquerda da imagem, é menor que a fêmea e a coloração do élitro é mais clara. A fêmea é maior, com coloração mais escura no seu élitro. Fotos do autor. 2016.

A temperatura em torno dos 32,5°C é a ideal para um rápido desenvolvimento do *C. maculatus* que completa o seu ciclo e emergem adultos em 22 dias (LIMA; OLIVEIRA; BARROS, 2001; SAVALLI; FOX, 1999).

As infestações pelo *C. Maculatus* podem iniciar no campo, com a postura de cerca de 80 ovos pelas fêmeas, e após a eclosão, a penetração da larva na semente onde irá se alimentar e pupar até sua fase adulta, causando perda de qualidade dos grãos infestados (MARSARO; VILARINHO, 2011). As fêmeas postam seus ovos de maneira uniforme, no entanto, quando o número de hospedeiros torna-se limitado, as fêmeas tendem a aumentar a postura de ovos em cada semente (COPE; FOX, 2003; MARSARO; VILARINHO, 2011).

Em relação ao tempo de vida, as fêmeas vivem em torno de 12 dias e os machos 10 dias (MITCHELL, 2012). Características como a cor da semente não influenciam na sua postura, observando-se somente uma predileção por sementes lisas a aquelas que apresentem uma textura rugosa (LIMA; OLIVEIRA; BARROS, 2001).

*C. maculatus* não infestam sementes do feijão comum pelo fato do *Phaseolus vulgaris* possuir inibidor de  $\alpha$ -amilase e essa proteína ser tóxica para esse caruncho (BIFANO *et al.*, 2010). Neste caso, o uso de cultivares resistentes constitui uma das táticas para controlar a predação por esse caruncho e uma alternativa ao controle químico (LIMA; OLIVEIRA; BARROS, 2001; MARSARO; VILARINHO, 2011).

Um dos fatores que está associado ao controle do *C. Maculatus* é o fato das sementes possuírem inibidores de tripsina em quantidade duas a três vezes maior do que em genótipos suscetíveis ao ataque desses carunchos, ou pela presença de uma variante da proteína vicilina de natureza tóxica que afeta o desenvolvimento do inseto (COSTA; BOIÇA JÚNIOR, 2004; LIMA; OLIVEIRA; BARROS, 2001).

## 2.6 Lectinas

Lectinas são proteínas que se ligam de modo específico e reversível a carboidratos, sendo encontrados em muitos tecidos vegetais, como cotilédones, raízes e cascas (BLAIR *et al.*, 2010). As lectinas são sintetizadas durante a germinação das sementes, e na fase do desenvolvimento, são hidrolisadas para

fornecer aminoácidos para o crescimento da plântula (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991).

Na via evolutiva do *P. vulgaris* um gene antecessor das Lectinas passou por um processo de duplicação, antes da especiação, dando origem as Lectinas verdadeiras e as Proteínas Relacionadas da Lectina (LIOI *et al.*, 2003). Essas últimas sofreram um novo processo de duplicação dando origem ao Inibidor de  $\alpha$ -amilase e, por uma nova duplicação, a todas *Arcelinas* (LIOI *et al.*, 2003).

Suportando a ideia de que um ancestral comum deu origem a todos os outros genes por duplicação em tandem e divergência das cópias dos genes parálogos, análises realizadas por alinhamento encontraram presença dos genes no mesmo *locus* bem como o alto nível de similaridade e *gaps* em regiões conservadas (BLAIR *et al.*, 2010; LIOI *et al.*, 2003).

Na cidade Arcelia, no Estado de Guerrero no México, foram identificados altos níveis de resistência ao bruquídeo em genótipos silvestres de feijão comum que estavam associados a uma classe particular de proteínas de sementes, as *Arcelinas* (Arc) (ROCHA *et al.*, 2007). *Arcelinas* são componentes de uma família multigênica das Lectinas e codificadas pelo *locus* APA [*Arcelina* (Arc)/ fitohemaglutinina (PHA)/ inibidor da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ AI) (OSBORN *et al.*, 1986; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, P; ZUKOVSKI, 2007; ZAUGG *et al.*, 2013).

A família dos genes APA é conhecida por consistir de um *cluster* localizado num mesmo *locus* no grupo de ligação B4 do mapa genético de feijão, sendo herdada de forma independente (BLAIR *et al.*, 2010).

As proteínas do *locus* APA são expressas apenas no eixo embrionário e nos cotilédones durante a formação da semente de feijão, podendo representar menos de 1% das proteínas totais no grão maduro (BLAIR *et al.*, 2010). As proteínas mais abundantes do *locus* APA são as PHA, que se ligam a carboidratos e são tóxicas para mamíferos e aves, e em seguida vêm os  $\alpha$ AI, que agem no trato digestivo de mamíferos e coleópteros, sendo porém, ineficazes no ataque do bruquídeo ao feijão (ZAUGG *et al.*, 2013).

A análise do alinhamento das sequências dos genes do *locus* APA mostrou que, em comparação com PHA, a *Arcelina* e  $\alpha$ AI apresentam a supressão de um ou de três segmentos curtos, e que estas deleções resultaram na falta de um ou dois loops (alças) nas estruturas tridimensionais da *Arcelina* e do  $\alpha$ AI (LIOI *et al.*, 2003).

A fitohemaglutinina é considerada lectina verdadeira, porque é o único membro da família que se liga a carboidratos, enquanto que nas arcelinas a ligação com carboidrato ocorre de maneira fraca enquanto que os  $\alpha$ AI são desprovidos dessa capacidade de ligação, por isso sendo conhecidos como proteína semelhante à lectina, do inglês *like-lectin* (LIOI *et al.*, 2003).

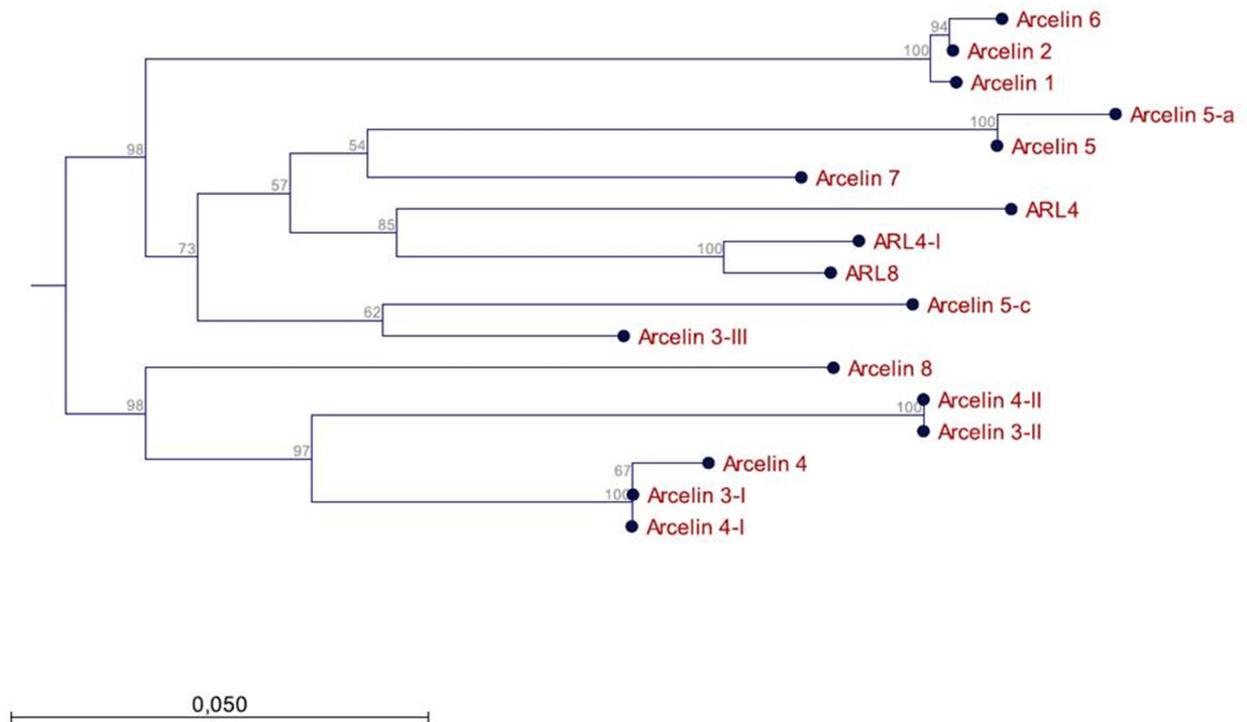
Com relação à antibiose, uma alimentação artificial contendo inibidor de  $\alpha$ -amilase mostrou que houve atividade inseticida dessa lectina resultando na redução da ovoposição do *C. maculatus*, no entanto a presença do PHA não apresentou resultados de antibiose contra esse caruncho (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; HUESING *et al.*, 1991; JANARTHANAN *et al.*, 2012).

A larva do *Z. subfasciatus* é capaz de se desenvolver na presença do inibidor de  $\alpha$ -amilase existente no feijão comum, devido a sua capacidade de hidrolisar essa proteína nas sementes logo no início da sua alimentação (BIFANO *et al.*, 2010; GROSSI DE SA *et al.*, 1997).

## 2.7 Variantes Do Gene Da Arcelina

Até meados de 2012 foram isoladas e caracterizadas sete variantes alélicas da *Arcelina* do *P. vulgaris* em acessos silvestres, designadas como *Arc1*, *Arc2*, *Arc3*, *Arc4*, *Arc5*, *Arc6* e *Arc7*, a partir de acessos silvestres (LIOI *et al.*, 2003; ZAUGG *et al.*, 2013).

Análise da evolução molecular (Figura 5) dos genes da arcelina mostrou que os genótipos *Arc-3* e *Arc-4* se agrupam juntos, sendo considerados os genótipos mais antigos e que podem ter sido separados de outros genes da arcelina por evento de duplicação: um primeiro evento separou os genes *Arc4*, *Arc3-I/Arc4-I* e *Arc3-II/Arc4-II* de um precursor em comum de todas as outras variantes e um novo evento de duplicação separou o subgrupo formado por *Arc1*, *Arc2* e *Arc6* do subgrupo formado pelos genes *Arc7*, *Arc3-III* e *Arc5*, conhecidos como subgrupos *Arc1* e *Arc5* (LIOI *et al.*, 2003; ZAUGG *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas clonadas que codificam as variantes da arcelina. GenBank IDs: *Arcelina 1* (Accession M19430), *Arcelina 2* (Accession M28470), *Arcelina 3-I* (Accession AJ534654), *Arcelina 3-II* (Accession AJ439387), *Arcelina 3-III* (Accession AJ519844), *Arcelina 4* (Accession U10351), *Arcelin 4-I* (Accession AJ439716), *Arcelin 4-II* (Accession AJ532486), *Arcelin 5* (Accession Z36943), *Arcelin 5-a* (Accession Z50202), *Arcelin 5-c* (Accession AF193029), *Arcelin 6* (Accession AJ001733), *Arcelin 7* (Accession AJ439566), *Arcelin 8* (Accession He650833), ARL 8 (Accession HE650835), ARL4 (Accession AJ439619), ARL4-I (Accession JQ675761). Autor. 2016.

Recentemente foram encontradas em genótipos silvestres de *Phaseolus vulgaris* de origem mexicana novas variantes *Arc*, referidas como *Arcelina-8* (Arc8) e *Arcelin-like 8* (ARL8) conhecidas com QUES (ZAUGG *et al.*, 2013). O alinhamento das sequências de aminoácidos das arcelinas junto com proteínas APA, mostrou que Arc-8 e ARL-8 estão agrupados com Arc4-1 e ARL4-1 (figura 4) (ZAUGG *et al.*, 2013).

As proteínas arcelina 1 e arcelina 2 possuem componentes com 31 e 37 kilodaltons (kD), e a sequência protéica mostrou que eles são altamente homólogos, se diferenciando no número de sítios de glicosilação, quando arc1 possui três sítios e arc2 somente dois sítios, representados pelo tripeptídeo asparagina-X-treonina/serina (Asn-Xaa-Thr/Ser) (FABRE *et al.*, 1998a; GOOSSENS *et al.*, 1994; SPARVOLI; BOLLINI, 1998).

## 2.8 Estrutura Da Proteína Arcelina-1

A proteína arcelina-1 possui 31kDa e 265 resíduos de aminoácidos na sua composição (FABRE *et al.*, 1998b; MOUREY *et al.*, 1998), visto na Figura 6. Na sua forma nativa, a arcelina-1 é uma glicoproteína dimérica de 60 kDa (FABRE *et al.*, 1998a).

A aparente massa molecular do monômero da arcelina-1 é menor do que o reportado para as formas monoméricas das variantes da arcelina isoladas de vários acessos de *P. vulgaris*: 1 (kDa), 2 (34.3 kDa), 3 (36.9 kDa) e 4 (36.9 kDa), e essa diferença pode ocorrer devido a um processamento no C-terminal durante as modificações pós-traducionais das lectinas nas sementes em processo de amadurecimento (FABRE *et al.*, 1998a).

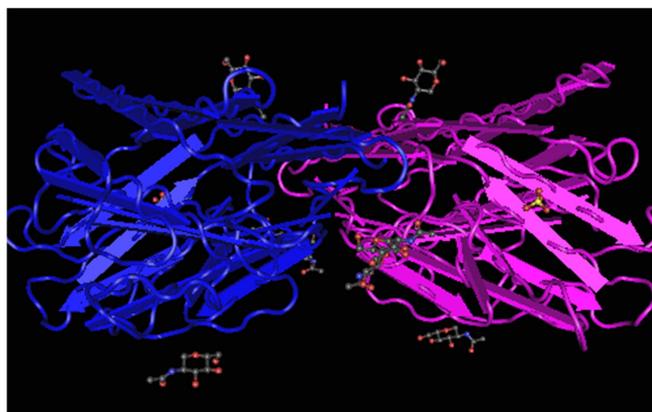
```

1 massnlltla lflvllthan ssndasfnve tfnktnlilq gdatvssegh llltnvkgne
61 edsmgrafys apiqindr ti dnlasfstnf tfrinaknie nsayglafal vpvgsrpklk
121 grylglfntt nydrdahtva vvfdtvsnri eidvnsirpi atescnfghn ngekaevrit
181 ydspkndlr v sllypsseek chvsatvple kevedwvsvg fsatsgskke ttethnvlsw
241 sfssnfinfk gkksersnil lnkil

```

**Figura 6.** Sequência dos aminoácidos da proteína Arcelin-1 [*Phaseolus vulgaris*]. Acesso: AAA33752. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA33752.1>. 2016.

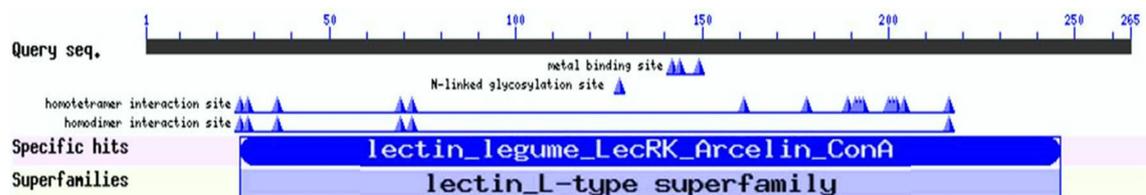
Na proteína arcelina-1 ao menos três tipos de estruturas quartenárias têm sido relatadas: a mais abundante é a cadeia dimérica arc1 de dois tetraméricas que são arc1t<sup>1</sup> e arc1t<sup>2</sup> (CORDEIRO *et al.*, 2000; LIOI *et al.*, 2003; SPARVOLI; BOLLINI, 1998). A estrutura 3D da proteína arc1 pode ser observada na figura 7 (MOUREY *et al.*, 1998).



**Figura 7.** Estrutura 3D da proteína arcelina. Imagem com a formação dimérica da arcelina-1. Acesso: NCBI. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=8859>>. 1998.

Os domínios da proteína é principalmente barril beta, e sua topologia tipo *Jelly Rolls* (MOUREY *et al.*, 1998).

Esta proteína se liga a carboidratos e está diretamente envolvida em processos bioquímicos associados à reserva de nutrientes. De acordo com a Classificação Estrutural da Proteína (SCOP), a arcelina-1 pertence à superfamília das lectinas do tipo concanavalina A/glucanases (figura 8).



**Figura 8.** Proteína Arcelin-1 (*Phaseolus vulgaris*). Acesso: AAA33752. NCBI. 1998.

As lectinas do tipo L encontradas nas sementes de leguminosas, constituem cerca de 10% da proteína solúvel do total do extrato bruto da semente, e são sintetizados durante o desenvolvimento da semente, algumas semanas após a floração (ETZLER; SUROLIA; CUMMINGS, 2009). Após serem sintetizadas, as proteínas são condensadas em vesículas especializadas chamadas de corpos protéicos, podendo permanecer neste estado até a germinação da semente (ETZLER; SUROLIA; CUMMINGS, 2009).

## 2.9 Atividade Inseticida Da Proteína Arcelina

Em relação à defesa induzida por herbivoria, foi observado que as proteínas arcelinas 4 e 1 foram consideradas as mais promissoras para conferir resistência ao feijão contra o bruquídeo *Z. Subfasciatus* (PAES *et al.*, 2000; ZAUGG *et al.*, 2013). E entre as pesquisas realizadas utilizando essas duas proteínas, arc1 mostrou ter um efeito inibitório mais eficiente no intestino da larva desse caruncho do que a arc4 (OSBORN *et al.*, 1986; PAES *et al.*, 2000) e dessa antibiose resultou a redução do número de adultos emergentes e na redução da fertilidade da fêmea, além da diminuição do crescimento do inseto, especialmente no primeiro e segundo estágios larvais do bruquídeo (ZAUGG *et al.*, 2013).

Dentre as proteínas arc1 a arc8, somente arc4, arc8 e ARL8 foram capazes de conferir resistência ao feijão comum para ambas às espécies de caruncho

*Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* (LIOI *et al.*, 2003; OSBORN *et al.*, 1986; ZAUGG *et al.*, 2013). A primeira evidência de antibiose do novo genótipo foi o aparecimento das fezes das larvas do bruquídeo *A. obtectus* de grandes quantidades de arc e ARL provenientes de QUES e sementes G12949 (ZAUGG *et al.*, 2013).

Em relação ao *Callosobruchus maculatus*, não existem trabalhos ligando a propriedade antibiose da Arcelina a esse caruncho, pois este inseto não é um predador natural do feijão comum. No entanto, foi realizado um trabalho no qual o *C. maculatus* foi alimentado com sementes artificiais contendo teores diferentes da proteína arcelina (Figura 9) e foi observado que com o aumento da presença dessas proteínas, houve uma diminuição evidente na emergência dos adultos (JANARTHANAN; SURESH, 2010).

% w/w arcelin in artificial seeds	Outposition	Adult Emergence	Developmental period (days)	Seed infestation (%)
0.00	24 ± 06.30	21 ± 4.53	20	32
0.02	30 ± 12.60	08 ± 3.07	26	12
0.04	12 ± 08.20	12 ± 1.58	26	18
0.06	27 ± 17.51	03 ± 1.14	26	08
0.08	08 ± 04.57	Nil	--	--
0.10	18 ± 04.63	Nil	--	--
0.15	21 ± 12.86	Nil	--	--
0.20	29 ± 04.66	Nil	--	--
0.25	04 ± 02.58	Nil	--	--
0.30	14 ± 07.50	Nil	--	--
0.35	20 ± 06.85	Nil	--	--
0.40	24 ± 12.10	Nil	--	--
0.45	14 ± 03.60	Nil	--	--
0.50	08 ± 04.96	Nil	--	--

**Figura 9.** Sementes artificiais contendo teores crescentes da proteína arcelina utilizadas em bioensaio com *C. maculatus* (JANARTHANAN; SURESH, 2010)

Com o aumento da concentração da proteína arcelina (w/w) não houve uma diferença significativa na oviposição do *C. maculatus* nas sementes artificiais, somente na porcentagem de sementes infestadas. Na concentração de 0.04 (w/w) houve um aumento na porcentagem de adultos emergentes, bem como no número de sementes infestadas. No entanto, na concentração 0.08 (w/w) da proteína na semente, não houve a emergência do adulto, relacionando a concentração da proteína com o efeito biocida na semente artificial.

A forma como a proteína arcelina atua é desconhecida, possivelmente as propriedades tóxicas dessa proteína podem estar relacionadas ao seu reconhecimento e interação com glicoproteínas e outros constituintes de membranas pertencentes ao trato digestivo dos insetos (BLAIR; SOLER; CORTÉS, 2012; LIOI *et al.*, 2003; OSBORN *et al.*, 1988).

Para Sales *et al* (2000) a presença da arcelina-1 na hemolinfa do *Z. subfasciatus* indica que essa proteína consegue atravessar as células que revestem o intestino médio, no entanto, não está claro se a larva desse inseto não se desenvolve devido a presença da proteína ou pelo resultado da ruptura do tecido epitelial do intestino (SALES *et al.*, 2000).

Trabalhos visando à obtenção de feijão comum resistente a insetos utilizando o gene da Arcelina já foram realizados (RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, P; ZUKOVSKI, 2007), mas não em feijão-caupi. No feijão-caupi algumas características de importância agrônômica já foram inseridas como a tolerância ao herbicida imazapyr, e resistência contra *Vírus do mosaico severo (Cowpea severe mosaic virus - CPSMV)*, utilizando a estratégia de RNAi (ABREU *et al.*, 2012; CITADIN *et al.*, 2012)

### 3 JUSTIFICATIVA

Quando se compara plantas domesticadas com seus ancestrais silvestres, encontram-se alterações morfológicas (SPARVOLI *et al.*, 2001; LIOI *et al.*, 2003) as quais finalizaram por tornar essa planta adaptada aos interesses dos agricultores ou do mercado. E essas alterações podem ter surgido por causa ambiental, genética ou mista, podendo-se mencionar mutação, hibridação interespecífica ou poliploidia (BLAIR *et al.*, 2010; LIOI *et al.*, 2003; SPARVOLI *et al.*, 2001; ZAUGG *et al.*, 2013).

A partir dessas alterações, provavelmente alguns genes ligados à resistência foram perdidos, resultando em plantas com características desejáveis para o mercado local, contudo sem resistência a alguns tipos de predadores (ZAUGG *et al.*, 2013). Cita-se, como exemplo, o feijão domesticado que perdeu genes que expressam a proteína arcelina, responsáveis por conferir resistência ao caruncho, e que podem ser encontrados nas espécies silvestres (ZAUGG *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores demonstraram a resistência do feijão ao *Z. subfasciatus* provida pela proteína arcelina expressa nas sementes dessa leguminosa (OSBORN *et al.*, 1988; RIBEIRO-COSTA; PEREIRA, P; ZUKOVSKI, 2007; ZAUGG *et al.*, 2013).

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de feijão-caupi resistente aos carunchos *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, pela introdução e expressão do gene codificador da *Arc1* (proteína arcelina-1) do feijão, visando o melhoramento de *Vigna unguiculata*.

#### 4 HIPÓTESE

A expressão do gene que codifica a proteína arcelina-1 em *Vigna unguiculata* resulta em aumento da tolerância aos carunchos *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*.

## 5 OBJETIVO GERAL

Obter plantas de feijão-caupi resistentes ao caruncho *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* e estudar o efeito biocida da arcelina-1 em feijão-caupi.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1.1 Avaliar a presença de genes que codificam as proteínas arcelinas em *Phaseolus vulgaris* cultivados e silvestres resistentes a carunchos;

5.1.2 Sintetizar o gene da *Arcelina-1* de *P. vulgaris* e cloná-lo em vetor de expressão pAHAS para inserção em feijão-caupi;

5.1.3 Obter plantas geneticamente modificadas de feijão-caupi expressando gene da proteína arcelina, conferindo resistência ao caruncho;

5.1.4 Realizar bioensaios com as plantas geneticamente modificadas para avaliar a resistência aos carunchos.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Material vegetal

Sementes maduras de *Phaseolus vulgaris* (L) e *Vigna unguiculata* (L.) foram obtidas na Embrapa-Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO) e Embrapa Meio Norte (Teresina, PI), respectivamente.

### 6.2 Criação de insetos

Carunchos de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) e *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) foram obtidos na Embrapa-Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO) e mantidos no laboratório de Entomologia na Plataforma de Criação de Insetos do Controle Biológico – CENARGEN, DF.

### 6.3 Extração de DNA genômico do feijão Arc100

Sementes do feijão Arc100 (Dr. Josias Correa – CNPAF) contendo isoalelos da *Arcelina*1 a *Arcelina*5 foram plantadas em casa de vegetação e após um período de três semanas, foi realizada análise dessas plantas retirando um disco foliar e a extração de DNA genômico pelo método CTAB 2% (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

### 6.4 Detecção do gene da *Arcelina* no feijão Arc100

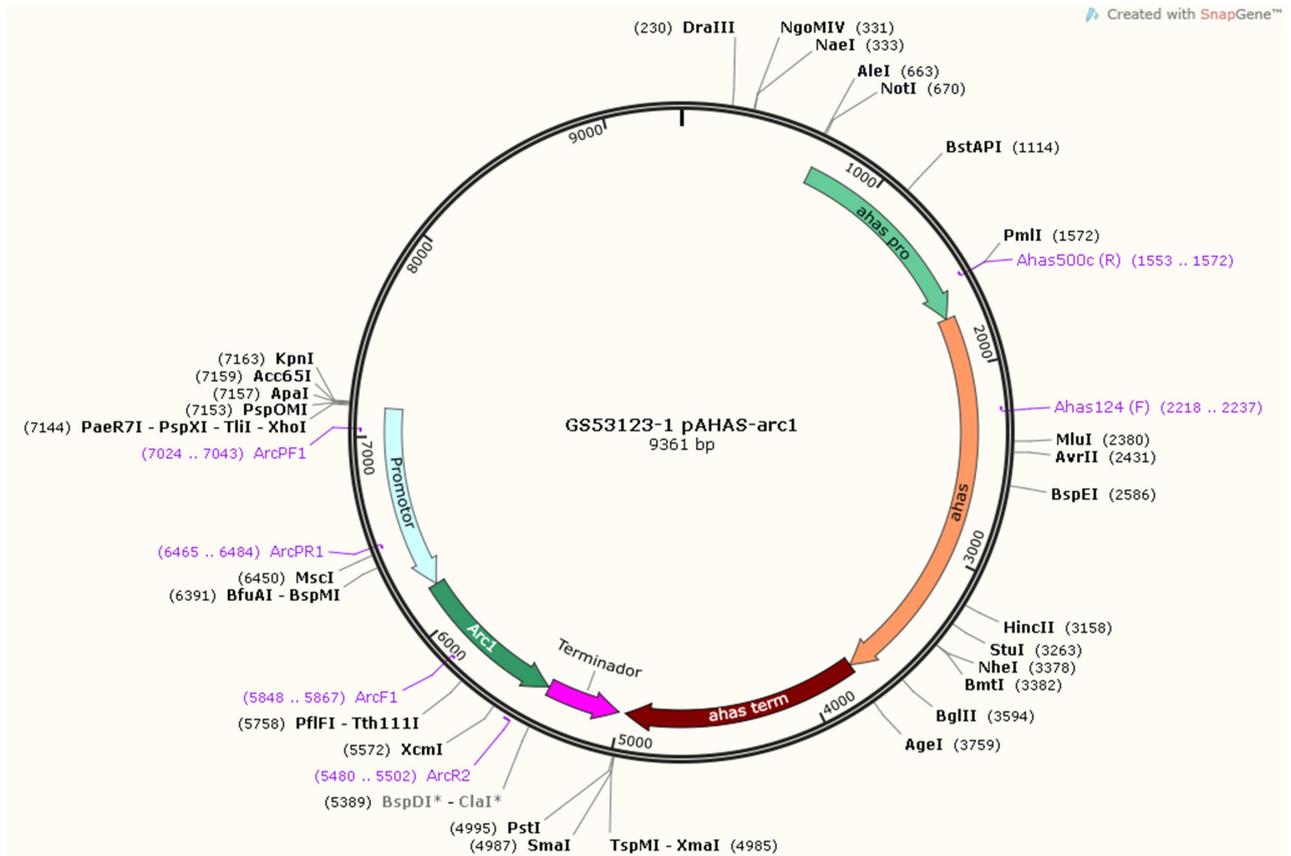
A partir do DNA extraído, uma alíquota na concentração de 10 ng (*Thermo Scientific Nano Drop 2000 spectrophotometer*) foi utilizada para fazer PCR com par de oligonucleotídeos iniciadores (primers) degenerados: Arc 1F 3'-5' CTCTCGTCCCCGTCGGCTCT e Arc1R 5'-3' TCCAGCGGCACTGTGGCAGA; e, Arc 5F 3'-5' ACAACCCCGAACCCAACGCC e Arc 5R 5'-3' TCCGTCAACCCTGAGGTGGCA, para detectar quais *Arcelinas* poderiam ser encontradas nos grãos do feijão dessa variedade. As condições da PCR foram de 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 35 ciclos de 55°C por 1 min 72°C por 1 min e 72°C por 7 min. Os produtos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1% e clonados no vetor pGEM®-T Easy para serem sequenciados.

### **6.5 Análise *in silico***

O alinhamento múltiplo das variantes do gene da Arcelina foi realizado usando o *software CLC Sequence Viewer 7.7.1*, a partir da região codificante (cds) completa da Arcelina do *Phaseolus vulgaris*. A análise foi realizada com sequências do Gen Bank (*National Center for Biotechnology Information*), e confirmadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

### **6.6 Construção de vetor para transformação por biobalística**

O gene que expressa a proteína arcelina-1 (contendo as regiões 5'3' codantes), com o tamanho 2.159 pb, denominado arc-1, foi clonado em um plasmídeo pAHAS (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2012), com o tamanho de 7.248 pb, contendo o gene *AtAhas* de *Arabidopsis thaliana* que confere tolerância a imidazolinonas e com o promotor Arcelina. Nesse vetor foi incluído um sítio de corte *Clal*, caso houvesse necessidade de substituir o promotor (figura 10).



**Figura 10.** Mapa circular do vetor G853123-1 pAHAS-arc1. Gene *Arcelina-1* com a região promotora, codificadora e terminadora, e o gene *AtAhas* com a região promotora, codificadora e terminadora. Em lilás tem-se os iniciadores do primer para o gene da *Arcelina* e do *AtAhas*. Autor. 2016.

## 6.7 Transformação do feijão-caupi por biobalística (IVO *et al.*, 2008)

Sementes maduras do feijão-caupi foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% (V/V) durante 1 min, seguindo por imersão em hipoclorito de sódio 1% durante 20 min e posteriormente foram lavadas cinco vezes em água ultra pura autoclavada. Na última lavagem as sementes ficaram embebidas em água entre 16 a 18 horas. Os eixos embrionários foram excisados a partir das sementes e os seus meristemas apicais caulinares foram expostos a partir da remoção das folhas primárias e primórdios foliares utilizando uma lupa e foram posicionados no meio de bombardeamento [Murashige-Skoog-Medium (MS) de sais basais e 0,8% phytigel Sigma, pH 5,8] com a região apical dirigida para cima. O bombardeamento foi realizado como descrito por Ivo (IVO *et al.*, 2008) com o vetor gerado pAHAS-Arc1. Inicialmente o vetor usado foi digerido utilizando a enzima FspI para retirar o gene da ampicilina existente no vetor. Após a remoção desse gene, o DNA foi então diluído (1:1) e usado para bombardear sementes de feijão-caupi. Após

bombardeamento, os eixos embrionários foram transferidos para um meio de indução de multibrotação contendo o agente seletivo (meio MS de sais basais, suplementada com 5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 3% de sacarose, imazapyr 300 mM e 0,6% de ágar, Sigma, pH 5,8) e incubados a 26°C com um fotoperíodo de 16 h (70 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Após um período de dois meses, os explantes que sobreviveram foram transferidos para um meio de enraizamento contendo carvão ativado a 0,1%. Passado um período de quinze dias, as plantas que apresentaram folhas largas e raízes desenvolvidas foram aclimatadas.

### 6.8 Aclimação

Para serem aclimatadas, as plantas que estavam em cultivo *in vitro* precisaram possuir ao menos duas folhas largas e raízes bem formadas. Plantas com essas características foram transferidas para copos transparentes de polietileno com capacidade de 250 mL, previamente perfurados, contendo vermiculita:solo e foram envolvidas em sacos plásticos por um período de 10 dias para se adaptarem as novas condições. Quando os sacos foram retirados, as plantas foram analisadas para a presença do gene de interesse.

### 6.9 Desenho dos iniciadores específicos (*primers*)

Tendo como base as sequências depositadas em bancos públicos NCBI e TIGR (*Plant Transcript Assemblies*), foram desenhados *primers* específicos para detectar e amplificar a presença da Arcelina em plantas cultivadas de *Phaseolus vulgaris* mRNA da Arcelina-1. ID da sequência: gb|M19430.1|PHVARC. NCBI.

### 6.10 Detecção do gene da *Arcelina* nas plantas transformadas por PCR

Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o gene da *Arcelina*, nas seguintes condições: ARCF1 3'-5' GGACTCTATGGGCCGCGCCT e ARCR2 5'-3' AGGACGTTGTGCGTTTCAGTGGT, nas condições 94 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 63°C por 1 min, 72 °C por 1 min e 72 °C por 7 min., obtendo um fragmento de 511 pb, para amplificação de do gene da arcelina.

### 6.11 Detecção do gene *Ahas* por PCR

Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores: *Ahas*: 3'-5' AHASP124 (F) ACTAGAGATTCCAGCGTCAC e 5'-3' AHAS500C (R) GTGGCTATACAGATACCTGG, nas condições 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 35 ciclos de 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 7 min., obtendo um fragmento de 680 pb, o qual indica a amplificação do gene *Ahas*.

### 6.12 Bioensaio (protocolo fornecido pela Embrapa Arroz e Feijão- GO)

O delineamento foi de acordo com o esquema fatorial de 3x01x10, com três repetições (A, B, C) um tratamento (Linhagem 5 ou Linhagem 3) e 10 casais de insetos. E, com o esquema fatorial 3x01x10, três repetições (A,B,C), um tratamento (controle) e 10 casais de insetos para o controle. Dez grãos íntegros de feijão da linhagem transgênica foram pesados em balança analítica de precisão e transferidos para um recipiente de plástico (9 cm de altura, 4 cm de diâmetro). Foram usadas 10 sementes da linhagem transgênica para cada frasco, totalizando 30 sementes (1A, 1B, 1C). A mesma metodologia foi utilizada com o controle (não GM). Em seguida, 10 casais de carunchos com no máximo 24 horas de idade foram adicionados em cada recipiente, os quais foram fechados com tecido de filó e atílio de borracha e armazenados em temperatura ambiente, 28°C±2°C, em ausência da luz. Após dois dias, os casais foram retirados dos recipientes com auxílio de um sugador manual e transferidos para outro recipiente de plástico, contendo 10 grãos do mesmo feijão avaliado (não GM), para determinar a longevidade. Dez dias após remoção dos adultos foi realizado a contagem do número de ovos por grão com auxílio de um microscópio estereoscópico no aumento de 40×. Os 10 primeiros casais de adultos emergidos de cada repetição foram utilizados na infestação de novos grãos no intuito de avaliar o desenvolvimento da geração subsequente do *Z. subfasciatus* e do *C. maculatus*. Após a emergência de todos os adultos, foi realizada a contagem do número de orifícios de emergência dos adultos por grão. A avaliação da viabilidade dos ovos foi com a divisão do número total de ovos nas sementes infestadas pelo número total de insetos emergidos em cada teste. A porcentagem de perda da massa dos grãos foi feita pela comparação do peso seco de grãos antes da infestação e dos grãos consumidos pelo caruncho após a infestação.

### **6.13 Western blot (Brasileiro e Carneiro, 1998)**

Para extração de proteínas, 200mg de sementes foram trituradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e colocados em tubos eppendorf 2,0 mL. Adicionou-se 0,5mL de tampão de extração (Tris-HCL 50 mM, pH 6,8 contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, NaCl 30mM, Triton®X-100 0,1%), e incubou-se por 1 hora, no gelo, sob forte agitação e em seguida, centrifugou-se por 30 min. a 10.000rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a concentração das proteínas foi baseado no método de Bradford (1976). Para o Western blot: as proteínas extraídas foram desnaturadas em temperatura 95°C sob condição de redução (Tris-HCl 125mM, pH6,8, SDS 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0,04%) e separado em gel SDS/PAGE (eletroforese gel de poli(acrilamida) 15%. A transferência para membrana Polyvinylidene fluoride (PVDF) foi feita utilizando o aparelho Bio-rad Trans-blot SD, 15 v por 40 minutos. A membrana foi bloqueada por 40 minutos em solução Tris-Salina TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, contendo leite desnatado em pó desnatado 5%) em temperatura ambiente sob agitação. A análise de imunodeteção foi realizada com anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra as proteínas APA, na proporção de 1:2000 em solução Tris-Salina TBS contendo leite desnatado 5%, *overnight*. Após a incubação, a membrana foi lavada 3X por 5 minutos com a solução Tris-Salina TBS (contendo leite desnatado 5% e Tween® 1%), e incubada durante 1h30 minutos em temperatura ambiente sob leve agitação com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, IgG anti-coelho, produzido em cabra (Sigma-Aldrich) e na diluição 1:20.000. Após esse período, a membrana foi lavada 3X por 5 minutos com a solução Tris-Salina TBS (contendo leite desnatado 5% e Tween® 1%) e revelada usando o substrato cromogênico BCIP®/NBT, sob leve agitação até o aparecimento da cor. Em seguida, foi lavado abundantemente com água destilada para finalizar a reação.

### **6.14 Dot blot (Brasileiro e Carneiro, 1998)**

Para a realização dessa análise, uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 mm. foi dividida em partes de 11 x 7,5 cm, e disposta num aparelho de blot (Mini fold tm SRC-96) de 96 poços, onde adicionou-se, em cada poço, 50  $\mu$ l do extrato total de proteína. A membrana foi bloqueada por 40 minutos em solução Tris-

Salina TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, contendo leite desnatado em pó desnatado 5%) em temperatura ambiente sob agitação. A imunodectecção foi realizada com anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra as proteínas APA, na proporção de 1:2000 em solução Tris-Salina TBS contendo leite desnatado 5%, *overnight*. Após a incubação, a membrana foi lavada 3X por 5 minutos com a solução Tris-Salina TBS (contendo leite desnatado 5% e Tween® 1%), e incubada durante 1h30 minutos em temperatura ambiente sob leve agitação com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, IgG anti-coelho, produzido em cabra (Sigma-Aldrich) e na diluição 1:20.000. Após esse período, a membrana foi lavada 3X por 5 minutos com a solução Tris-Salina TBS (contendo leite desnatado 5% e Tween® 1%) e revelada usando o substrato cromogênico BCIP®/NBT, sob leve agitação até o aparecimento da cor. Em seguida, foi lavado abundantemente com água destilada para finalizar a reação.

#### **6.15 Ensaio imunológico por ELISA indireto (Brasileiro e Carneiro, 1998)**

Adicionou-se 50 µl do extrato proteico total a cada poço de uma placa para ELISA e após uma rápida agitação, a placa foi selada e incubada por 4 horas em uma estufa a 37°C. Após esse período, a placa foi lavada com PBS 150 µl por 5 minutos e essa solução foi descartada. Repetiu-se três vezes esse passo. Para o bloqueio foi adicionado 200 µl de PBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 8) com leite desnatado (10%) e a placa foi incubada em câmara úmida, durante 16 horas. Repetiu-se a lavagem com 150 µl PBST (Tween®20 0,05%; v/v) durante 5 minutos, por três vezes. Adicionou-se 90 µl de anticorpo primário policlonais produzido em coelho e contra proteínas APA diluído 1:1000 em PBS e leite desnatado (10%) em cada poço e a placa foi incubada por um tempo de 14 horas em câmara fria. Finalizando este período, a placa foi lavada com PBST, como nos passos anteriores. Para o segundo bloqueio, foram adicionados 90 µl anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, IgG anti-coelho, produzido em cabra (Sigma-Aldrich) e na diluição 1:20.000 (PBS e leite desnatado 10%) e a placa foi incubada em estufa a 37°C por três horas. A placa foi novamente lavada com PBST como nos passos anteriores e em seguida foi adicionado 50 µl do tampão de reação em cada poço (5mg de p-Nitrofenil - pNPP//5mL de dietanolamina, pH 9,6) e a placa incubada em temperatura ambiente ou 37°. Leitura da absorbância a 415nm de comprimento de onda.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Transformação Genética

Em trabalhos anteriores utilizando sementes da linhagem Arc100 (*Phaseolus vulgaris*), a qual contém isoalelos do gene da *Arcelina*, foi observado que estas sementes eram capazes de conferir resistência à infestação do caruncho *Z. subfasciatus*, tendo como resultado a redução da oviposição, dos adultos emergentes e da perda dos grãos a partir da quinta geração (ARAGÃO; FARIA, 2010)

No intuito de se buscar quais os genes estariam presentes nas sementes da linhagem Arc100, algumas sementes foram plantadas em casa de vegetação e após um período de três semanas foi realizada análise DNA das folhas de acordo com o procedimento descrito em material e métodos (3.2.1). A análise do DNA extraído foi por PCR, de acordo com o descrito no material e métodos (3.2.2)

Os produtos amplificados foram confirmados em gel de agarose (1%), e em seguida excisados, purificados e depois clonados em *pGemT Easy*®. Os clones foram inoculados em placa de elisa 96 poços contendo 1mL de CircleGrow (CG) com ampicilina (10 ng/mL), e após realizada extração de DNA plasmidial, os clones foram seqüenciados (DUTRA; RODRIGUES, 2003). As sequencias foram analisadas utilizando MEGA5, a partir da região codificante (cds) completa da *Arcelina* no *Phaseolus vulgaris*, em busca de sequencias diferentes. Os múltiplos alinhamentos foram realizados com sequencias do GenBank (National Center for Biotechnology Information).

As análises das sequencias alinhadas foram confirmadas por BLAST no NCBI, de acordo com material e métodos (3.2.3). Com o alinhamento, observou-se que 90% das sequencias alinhadas possuíam similaridade com as sequencias do gene que codifica *Arcelina 1*.

Após identificar o gene presente na semente Arc100, o objetivo foi extrair e clonar o gene da *Arcelina* no plasmídeo pAhas. Após algumas tentativas sem sucesso, optou-se por sintetizar a sequencia no vetor denominado GS53123-1 pAhas-arc1 (figura 10).

Com o vetor sintetizado, foram realizados 27 procedimentos de bombardeio utilizando 1.690 embriões de feijão-caupi. Para os 13 primeiros eventos utilizando a metodologia de biobalística foi utilizada a variedade BRS Imponente e os últimos 14 eventos foram realizados utilizando uma nova linhagem do feijão-caupi, o Bocanegra (Figura11).

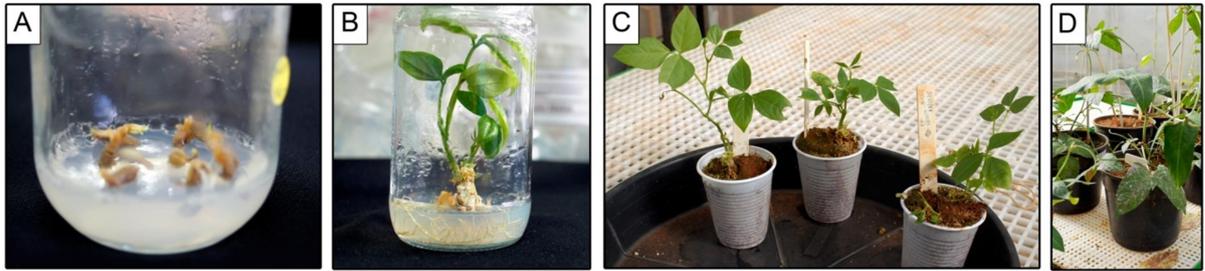
**Tabela 1.** Dados da transformação do feijão-caupi da variedade BRS Imponente e da linhagem Bocanegra (Black-eyedpeas).

<b>Variedade</b>	<b>Concentração Imazapyr</b>	<b>Explantes</b>	<b>Plantas positivas</b>
BRS Imponente	250nM	180	03
BRS Imponente	350nM	60	0
BRS Imponente	300nM	540	05
Bocanegra (Black-eyed peas)	300nM	910	13

Para seleção *in vitro* de plantas positivas foi utilizado inicialmente o agente seletivo imazapyr na concentração de 250 nM, entretanto devido ao grande número de escapes foi testado a concentração de 350 nM, onde somente algumas plantas que sobreviveram mostraram-se muito aclorofiladas e não resistiam a fase de aclimação. Testou-se então a concentração de 300 nM, onde os escapes tornaram-se menores entre as plantas resistentes ao herbicida.

A partir desse procedimento, 106 plantas resistiram à fase de seleção e foram transferidas para um meio de enraizamento. Quando essas plantas apresentaram folhas largas e raízes bem formadas foram aclimatadas em casa de vegetação.

Na figura 11 tem-se representadas as etapas de transformação do feijão-caupi, do pós bombardeamento, com os eixos embrionários em meio de seleção contendo imazapyr, da fase de aclimação, até a planta na fase vegetativa.



**Figura 11.** Etapas da transformação do feijão-caupi: (A) Axes embrionários do feijão-caupi em meio de seleção Imazpyr (300 nM); (B) Plantas já selecionadas em meio de enraizamento; (C) Plantas aclimatadas em casa de vegetação; (D) Plantas na fase vegetativa.

Na figura 11 a seleção de explantes transformados e resistentes ao Imazpyr, (nesta fase os eixos embrionários não transformados morrem por ação desse agente seletivo); Figura11.B: fase de enraizamento onde o explante fica isolado em um meio de MS(1/2) para que consiga se desenvolver, nesta fase espera-se o aumento da largura das folhas e enraizamento (11.B); Figura11.C: a planta é aclimatada após o desenvolvimento e continua se desenvolvendo até a sua fase vegetativa (11.D). Todo o ciclo, desde a transformação até a fase vegetativa, dura cerca de 4 a 6 meses.

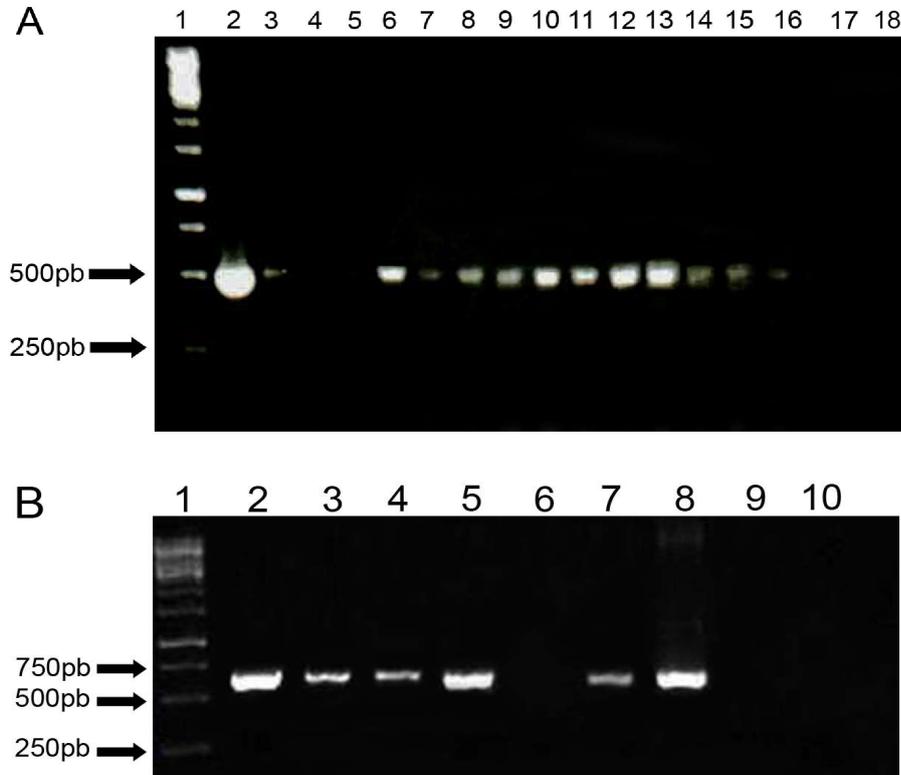
## 7.2 Confirmação Plantas GM Da Variedade BRS Imponente

As plantas transformadas da variedade BRS Imponente após serem aclimatadas, foram confirmadas por análise de PCR para a presença do gene da *Arcelina*. As plantas confirmadas como positivas foram transferidas para vasos maiores e as negativas descartadas. Dentre as plantas positivas, algumas morreram antes de alcançar a fase vegetativa. Das plantas positivas que chegaram a fase vegetativa, as plantas da geração  $T_0$ , denominadas 1, 3, 5 e 19, foram analisadas para a presença do gene da *Arc1* na geração  $T_1$ .

Considerando o número de embriões transformados e de plantas transgênicas obtidas com a passagem do gene para a geração  $T_1$ , tem-se uma taxa de eficiência de transformação de 0,25%.

A taxa de eficiência de transformação pode ser obtida a partir do número de plantas positivas geradas, divididas pelo número de explantes utilizados no bombardeamento, multiplicado por 100.

Alguns resultados das análises por PCR das plantas da geração  $T_0$  podem ser observados na figura 12.



**Figura 12.** Análise das plantas transformadas da variedade BRS Imponente. (A) Análise da geração  $T_3$  da Linhagem 5 para o gene da *arcelina* (511 pb). Canaleta 1: Marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Canaleta 2: Controle positivo; Canaletas 3 a 14: Linhagem 5; Canaleta 15: Linhagem 33; Canaleta 16: Linhagem 34; Canaleta 17: Controle negativo; Canaleta 18: Branco. (B) Análise por PCR para a presença do gene *Ahas* (680 pb). Canaleta 1: Marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Canaletas 2 a 7: Linhagem 5; Canaleta 8: controle positivo; Canaleta 9: controle negativo; Canaleta 10: Branco.

Na figura 12 (A) a progênie  $T_3$  da planta da L5 confirmada foi amplificada utilizando o primer do gene que codifica para *Arcelina*, de 14 plantas analisadas, duas plantas foram consideradas negativas (núm. 4 e 6), e cinco plantas (núm. 4; 5; 14; 15 e 16) foram novamente confirmadas em análise por PCR. A figura 12 (B) mostra o resultado da análise por PCR para a amplificação do gene *Ahas* na mesma progênie testada para a presença do gene da *Arcelina*.

### 7.3 Confirmação Plantas GM - Feijão Bocanegra (*Black-eyed peas*)

A linhagem Bocanegra (*V. unguiculata*) foi escolhida porque apresenta o meristema apical mais visível, diminuindo as perdas dos embriões durante a remoção das folhas primárias e dos primórdios foliares.

Sementes dessa linhagem foram esterilizadas (etanol 70% v/v por 1 min. e Hipoclorito de sódio 2% por 15 min) e deixados imersos em água ultra pura autoclavada por 16 horas. Os eixos embrionários das sementes foram excisados e o meristema apical exposto, após a remoção das folhas primárias e dos primórdios foliares sob estereomicroscópio.

Os explantes que não possuíam a característica desejada no meristema apical foram descartados e os que possuíam, foram cultivados *in vitro* até a fase de aclimação, quando foram transferidos para casa de vegetação, de acordo com a metodologia **6.8**.

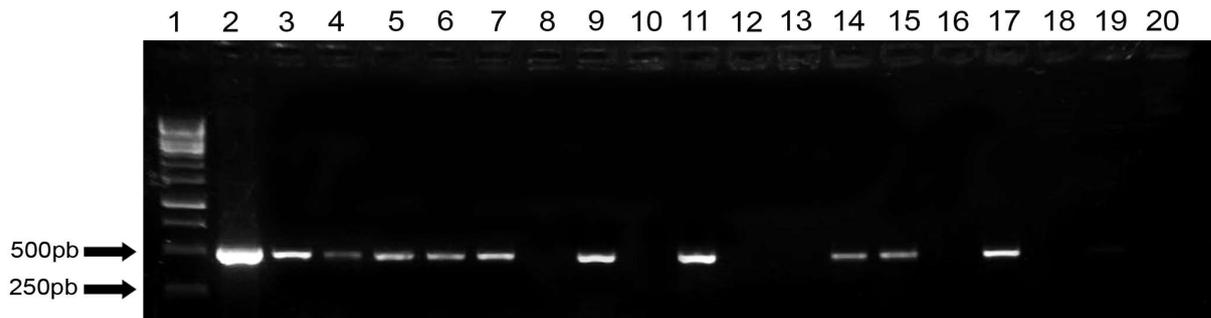
Na fase reprodutiva, foi realizado um *screening* das plantas, onde sementes de cada planta foram escolhidas aleatoriamente e o embrião, de cada semente, foi analisado para a ocorrência do meristema apical com a característica morfológica desejada.

As plantas cujas sementes apresentavam embrião com meristema apical desejado foram continuadas em casa de vegetação para originar novas progênes, e as plantas que não possuíam essa característica no embrião da semente, foram descartadas. Esse procedimento ocorreu até que se atingisse a geração T<sub>3</sub>.

Após o melhoramento, o vetor GS53123-1 pAhas-arc1 foi utilizado para ser inserido nos embriões da linhagem do Bocanegra pela metodologia de biobalística.

Assim como na variedade BRS Imponente, na linhagem Bocanegra foram obtidas plantas transformadas geneticamente, confirmadas a partir de análises por PCR.

Na Figura 13 pode ser observado o resultado da análise de algumas plantas da geração T<sub>0</sub> da variedade Bocanegra utilizando o par de primer para amplificação do gene da arcelina (511pb).



**Figura 13.** Análise por PCR da presença do gene da *Arcelina* na geração T<sub>0</sub> da linhagem Bocanegra (511 pb). Canaleta 1: Marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Canaleta 2: controle positivo; Canaleta 3: 60; Canaleta 4: 80; Canaleta 5: 81; Canaleta 6: 82; Canaleta 7: 83; Canaleta 8: 84; Canaleta 9: 85; Canaleta 10: 86; Canaleta 11: 87; Canaleta 12: 88; Canaleta 13: 90; Canaleta 14: 91; Canaleta 15: 92; Canaleta 16: 93; Canaleta 17: 75; Canaletas 18 a 19: controle negativo; Canaleta 20: Branco.

Do total dos embriões da linhagem Bocanegra transformados por biobalística, 18 plantas foram analisadas para a confirmação da presença do gene da *Arcelina*.

Nessa linhagem, 13 plantas foram positivas para a presença do gene na geração T<sub>0</sub>. Dentre as plantas analisadas, as linhagens 84, 86, 88, 90 e 93 (Figura 13) não tiveram a presença do gene da *Arcelina* confirmado por PCR na progênie, sendo descartadas. As linhagens 53, 54 e 55 (dados não mostrados) tiveram a passagem do gene confirmada para a geração T<sub>1</sub> com taxa de eficiência de transformação de 0,32%. As plantas positivas estão sendo multiplicadas em casa de vegetação.

A transformação por biobalística para meristemas apicais tem-se mostrado eficiente, como no caso da soja e do algodão, cuja eficiência de transformação fica em torno de 0,8% e 0,7%, respectivamente (IVO *et al.*, 2008)

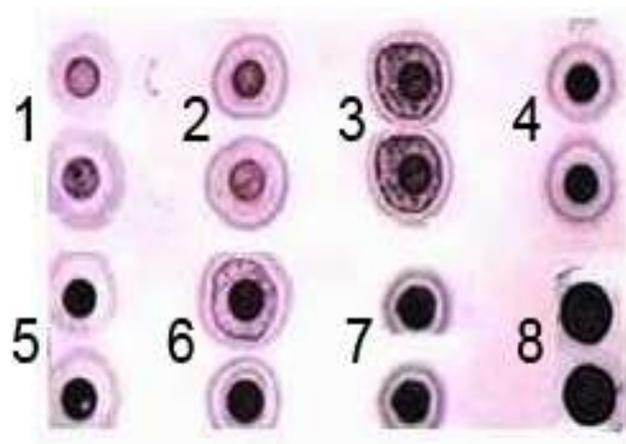
As plantas positivas dessa linhagem cultivadas em casa de vegetação se desenvolveram em um tempo menor do que a variedade BRS Imponente, chegando a formar vagens em torno de 110 dias após terem sido aclimatadas.

#### 7.4 Detecção Por Dot Blot Da Presença Da Proteína Arcelina Em Plantas Transformadas

Antes da análise das proteínas, estas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). Após as proteínas serem quantificadas, foram utilizados 20 µL (2 µg/µL) de proteínas (extrato bruto) extraídas de sementes para a realização desta análise.

Foram analisadas as gerações T<sub>4</sub> da Linhagem 5 (L5) e da Linhagem 3(L3) (BRS Imponente), a geração T<sub>1</sub> das linhagens 54 e 55 (Bocanegra) e gerações T<sub>4</sub> do controle negativo. Como controle positivo, foram extraídas proteínas da semente Arc100 (Figura 14).

Para melhor visualizar os resultados, as progênie foram separadas após a identificação da linhagem a qual pertencem, como no caso da L5 (35), que representa Linhagem 5 – progênie 35 e assim sussecivamente.



**Figura 14.** Análise da presença da proteína por Dot blot. 1 – Controle negativo.; 2– Linhagem 5 (35); 3 – Linhagem 5 (9); 4– Linhagem 54 (2); 5 – Linhagem 55; 6 – Linhagem 3 (11); 7 – Linhagem 3 (1); 8 – Controle positivo (Arc-100).

O número 1 da Figura 14 é o controle negativo e o número 8 é o controle positivo. A diferença entre esses controles é no aparecimento de um núcleo mais forte no controle positivo, enquanto que no controle negativo este núcleo mostra-se com uma coloração mais fraca. O controle negativo pode ser reconhecido pelo anticorpo provavelmente devido ao fato do *V. unguiculata* possuir como proteína endógena a lectina cujas sequencias de aminácidos são similares (49%) aos membros da família APA.

Nessa figura, a L5 mostrou nível de expressão baixa da proteína quando se compara ao controle positivo. Enquanto que na L3 o nível de expressão da proteína é maior, com uma coloração do núcleo mais intensa.

As linhagens 54 e 55, ambas da geração T<sub>1</sub>, mostraram estarem expressando a proteína arcelina muito próximo a expressão encontrada no controle positivo, e por este motivo estão sendo multiplicadas em casa de vegetação.

## 7.5 Detecção Da Proteína Arcelina Por *Western Blot*

As proteínas extraídas de sementes do feijão-caupi L5 foram analisadas por *western blot*, com anticorpo policlonal específico produzido em coelho para as lectinas e proteínas do locus APA, de acordo com a metodologia **6.13**.

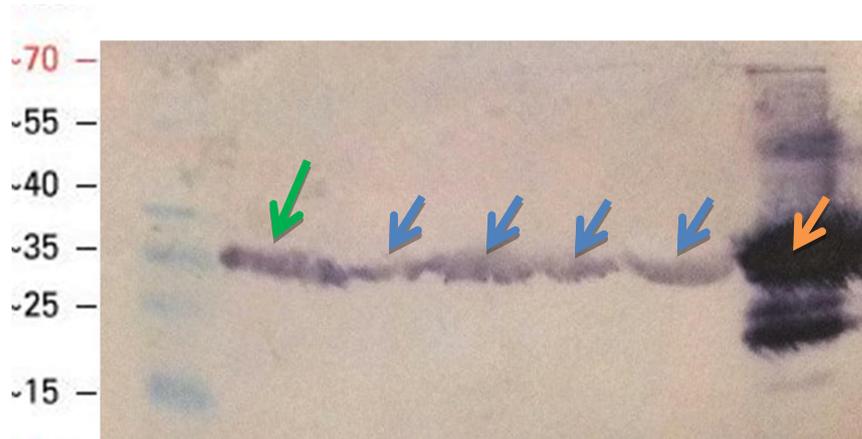
As proteínas do extrato bruto das linhagens analisadas foram quantificadas e utilizadas na concentração de 80 $\mu$ g para análise do *Western blot*, enquanto que no controle positivo (Arc100) foram utilizadas proteínas na concentração de 5  $\mu$ g.

Como o anticorpo policlonal reconhece proteínas da família APA, e pelo fato da linhagem Arc100 possuir isoalelos da *Arcelina* e outros genes da família APA, obteve-se um resultado no qual as proteínas do controle positivo produzidas em altas concentrações são reconhecidas pelo anticorpo, produzindo um precipitado cromogênico formado maior em relação às demais amostras analisadas (Figura 15).

A altura da marcação (seta azul) com aproximadamente 31kDa é a esperada para arcelina (FABRE *et al.*, 1998), enquanto o controle negativo apresentou uma marcação mais alta, em torno de 35 KDa esperada para a proteína lectina (LIOI *et al.*, 2006).

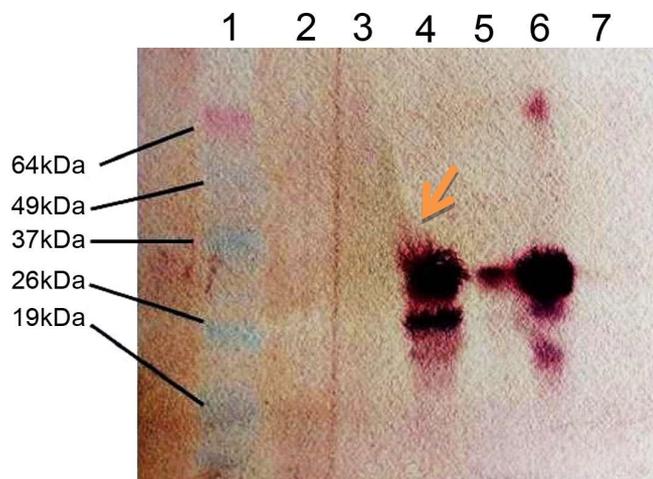
A marcação do controle negativo pode ter ocorrido, de acordo com Sparvoli (SPARVOLI & BOLLINI 1998), porque na concentração de 1:2000, espera-se que este anticorpo policlonal tenha preferência pela detecção da arcelina, entretanto o mesmo pode reconhecer proteína lectina, que é endógena na planta selvagem. Sendo as lectinas ortólogas, estas possuem homologia entre a sequência de aminoácidos, assim o anticorpo pode ser capaz de reconhecer sítios dentro das proteínas das lectinas.

Esse fato pode justificar a marcação da lectina na planta selvagem (que por não ser transgênica não apresenta a arcelina, e nesse caso o anticorpo reconhece a lectina), bem como a marcação da arcelina na planta transgênica preferencialmente à lectina endógena. Assim, na ausência da arcelina-1, o reconhecimento ocorrerá na proteína homóloga.



**Figura 15.** Análise da expressão das proteínas por *Western blot*. Marcador Page Ruler™ Prestained Protein Ladder. Seta verde – controle negativo (35KDa). Setas azuis –proteínas arcelinas (31KDa) expressas em sementes transgênicas da L5. Seta laranja – controle positivo.

Para análise das proteínas expressas nas sementes da L3, foi utilizado uma concentração de 40 µg (4 µg/µL) do total de proteína bruta extraída (Figura 16). Observa-se que a expressão das proteínas não é uniforme, algumas progênes dessa linhagem apresentam uma intensidade menor na expressão, como no caso da L3 (15-8) e L3 (03).



**Figura 16.** Análise das proteínas expressas na linhagem 3. Canaleta 1: Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Branco; Canaleta 4: Controle positivo (Arc-100) – seta laranja; Canaleta 5: Linhagem 3 (15-08); Canaleta 6: Linhagem 3 (15-01); Canaleta 7: Linhagem 3 (03).

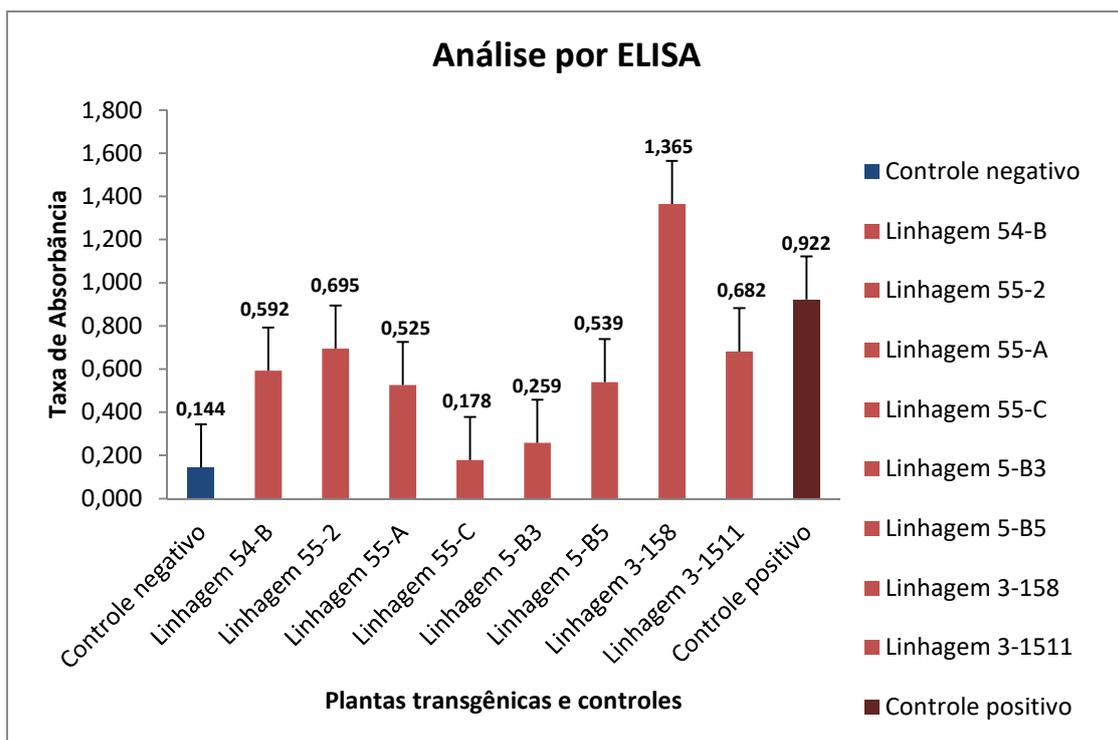
No intuito de diminuir o reconhecimento da proteína lectina no controle negativo, optou-se por aumentar o bloqueio para 10% (leite desnatado) e a concentração do anticorpo primário (1:1000) e do secundário (1:20.000), havendo

uma resposta positiva nesta nova metodologia sem que ocorresse o reconhecimento da proteína endógena no controle.

## 7.6 Resultado Da Análise Das Sementes Por Elisa Indireto

Para se analisar a expressão da proteína arcelina nas progênes das plantas transgênicas das Linhagens 5, 3, 54 e 55, além do controle negativo, foi utilizado o teste de ELISA indireto (Figura 17).

Foram aplicados em cada poço 50µl do extrato bruto de proteína, correspondendo a 2µg/µl, utilizando-se, desta forma, cerca de 100 µg de proteínas em cada poço. Para melhor entendimento, como ocorreu no Dot blot e *Western blot*, após identificação da linhagem, tem-se a identificação da progênie correlata.



**Figura 17.** Análise das linhagens transgênicas e do controle negativo por ELISA indireto. Foram utilizadas linhagens transgênicas 54, 55, 5 e 3, e o controle negativo (planta não transformada) e para o controle positivo, proteína extraída da linhagem Arc100. Após a identificação da linhagem, tem-se a identificação da progênie estudada.

O controle negativo em azul apresenta valores próximos as linhagens 55 (C) e 5 (B3), possivelmente devido a baixa expressão da proteína arcelina-1 nas

linhagens transgênicas, e no controle, devido a presença da proteína endógena lectina a qual pode ser detectada pelo anticorpo primário.

Pela análise de ELISA semi-quantitativa, a L5 apresenta uma expressão baixa da proteína, principalmente a L5 (B3), enquanto que a L3 mostra uma alta expressão da proteína, o que está de acordo com o resultado encontrado no *dot blot* (Figura 14) e no resultado do *Western blot*, figuras 15 e 16 os quais demonstram que diferença de expressão nessas duas linhagens. A proteína não está sendo expressa com a mesma intensidade nas linhagens transgênicas, apresentando uma maior expressão na L3, quando se compara as outras linhagens.

Para o controle positivo foram usados 10  $\mu$ l (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) em cada poço da placa de ELISA, um valor 20 vezes menor aos das amostras analisadas, devido as proteínas expressas pelas sementes da linhagem Arc100 serem reconhecidas pelo anticorpo utilizado, o que poderia resultar em uma leitura que extrapola o limite de absorvância neste comprimento de onda (415nm).

### 7.7 Análises Das Sementes Utilizadas Nos Bioensaios

As sementes da L5 e da L3, na geração T<sub>4</sub>, foram analisadas para a presença do gene da *Arcelina*. Na Figura 18 foram realizadas extrações de DNA de sementes utilizando o protocolo CTAB 2%, observa-se a presença do gene da *Arcelina* na geração da T<sub>4</sub> da L5 e da L3.



**Figura 18.** Análise das sementes da geração T<sub>4</sub> da Linhagem 5 para presença do gene da *Arcelina*. Canaleta 1: Marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Canaletas 2 a 5: controle negativo; Canaletas 9 a 12: Linhagem 5; Canaletas 13 a 14: Linhagem 3.

As sementes analisadas, tanto para presença do gene quanto para a expressão da proteína, foram escolhidas de forma aleatória antes de serem

utilizadas para os bioensaios. e, em todos os bioensaios foram escolhidas progênes diferentes das linhagens 5 e 3, todas na geração T<sub>4</sub>.

A análise da progênie realizada pelo teste qui-quadrado demonstrou padrão de segregação Mendeliana na geração T<sub>0</sub> da L5 e da L3 obteve como resultado, com  $X^2= 0,904$ ;  $p=0,27$ ;  $df=1$  na Linhagem 03 e,  $X^2= 0,259$ ;  $p=0,256$ ;  $df=1$  na Linhagem 05.

### **7.8 Bioensaio Com *Callosobruchus maculatus***

Para o bioensaio, foram separadas 30 sementes de feijão não transgênico (controle) e 30 sementes de feijão transgênico (L5 ou L3). Essas sementes foram separadas em réplicas, onde cada réplica possuiria 10 sementes de feijão, totalizando 3 réplicas para o controle e 3 réplicas para o feijão transgênico. Cada réplica recebeu uma numeração para identificação e as sementes foram pesadas.

No laboratório de Entomologia, na Plataforma de Criação de Insetos do Controle Biológico, os bruquídeos *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* inicialmente foram criados e adaptados ao clima de Brasília/DF, por duas gerações, e após o nascimento dos primeiros animais na terceira geração, estes foram separados e sexados. Após esse procedimento, os bioensaios foram iniciados utilizando 10 casais para cada réplica. Os bioensaios então foram realizados de acordo com o descrito em material e métodos, **6.12**.

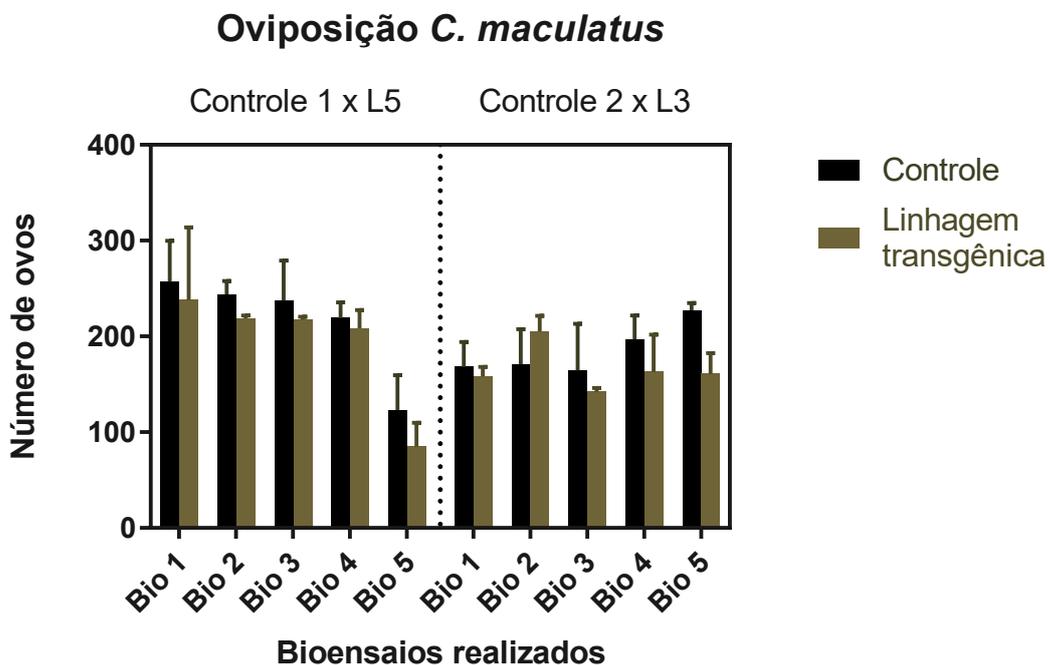
Após 48 horas, os casais utilizados foram relocados para outro recipiente. Ao final de 10 dias após o início do bioensaio, foi realizada a contagem dos ovos. Quando os 10 primeiros casais emergiram, estes foram utilizados para dar início ao um novo bioensaio, e os animais que foram emergindo diariamente, foram contados, pesados e sexados para registrar o número de machos e fêmeas. Após a retirada de todos os animais, as sementes foram novamente pesadas em uma balança analítica para verificar o peso final dos grãos. E assim sucessivamente até o quinto bioensaio.

As sementes não transgênicas (controle) foram, neste experimento, denominadas controle 1 e controle 2 para melhor visualização dos resultados, no entanto, as sementes são provenientes da mesma linhagem.

Quanto as linhagens transgênicas utilizadas, foram denominadas L5 as sementes pertencentes a Linhagem 5 e L3 as sementes provenientes da Linhagem

3. Tanto o controle quanto as linhagens transgênicas são da variedade BRS Imponente.

Para avaliar a variável resposta oviposição tomou-se a média de oviposição das três repetições e, desta forma, obteve-se uma amostra de cinco valores da oviposição com grãos não transgênicos e outra amostra de cinco valores da oviposição com grãos transgênicos. Na Figura 19 observa-se o registro da oviposição nos cinco bioensaios.



**Figura 19.** Média da oviposição nos cinco bioensaios do *C. maculatus* nas linhagens transgênicas L5, L3 e sementes controle.

Para avaliar os resultados da oviposição foi realizado o teste  $t$  cujas hipóteses estatísticas são as seguintes:

$H_0$ : o percentual de oviposição das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são iguais;

$H_1$ : o percentual de oviposição das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são diferentes.

No bioensaio com controle x L5, foi obtido o valor  $t = 0,6195$  equivalendo ao  $p$ -valor = 0.5. Desta forma o teste foi significativo ao nível = 0.6 e, assim, rejeitou-se a hipótese  $H_1$ , aceitando-se a hipótese  $H_0$ , a oviposição foi igual para a L5 e o controle.

Enquanto que, no controle x L3, foi obtido o valor  $t = 1,244$  equivalendo ao  $p$ -valor = 0.24, como no bioensaio com a L5, aceitou-se a hipótese  $H_0$ , ou seja, não houve diferença na oviposição entre os bioensaios.

A oviposição nas linhagens transgênicas não apresentou uma diferença significativa quando comparada a oviposição dos insetos no controle, e para esta questão a literatura traz que a concentração da proteína arcelina, quando em baixas quantidades, não apresenta diferença expressiva na oviposição do inseto *C. maculatus* (JANARTHANAN *et al.*, 2012), somente no seu desenvolvimento.

No bioensaio com L3 observou-se uma pequena alteração na postura de ovos, começando com a média de 17 ovos por fêmea, aumentando no segundo bioensaio para 19 ovos por fêmea, e no quinto bioensaio com a média de 15 ovos por fêmea. Enquanto que no controle a média inicial de oviposição foi de 16 ovos por fêmea, chegando ao quinto bioensaio com a média de 23 ovos por fêmea, aumentando em cerca de 40% a quantidade de ovos depositados nas sementes do controle.

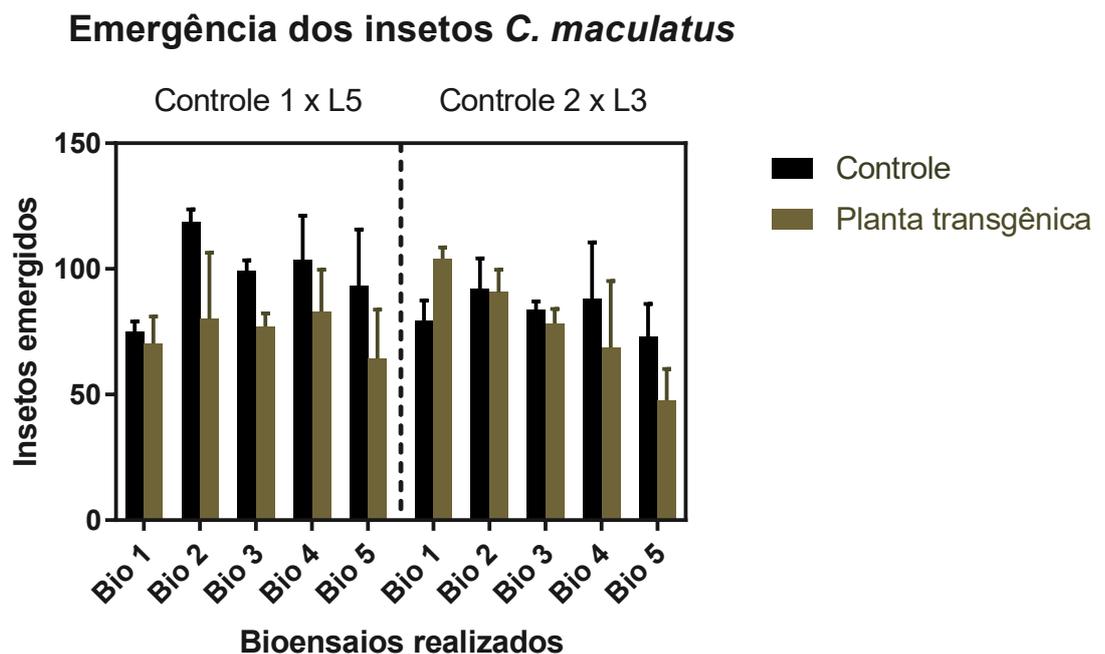
Em reação à quantidade de ovos postos por fêmeas do *C. maculatus*, tem-se na literatura que o número de ovos por fêmea pode ser diferente, dependendo da quantidade de dias de exposição dos casais com os grãos infestados, onde até sete dias de oviposição pode-se chegar a números entre 36 e 76 ovos por fêmea.

O *C. maculatus* apresentou resistência moderada à presença da proteína arcelina nas sementes, quando se compara ao controle. Essa mesma resistência foi observada em outro trabalho o qual utilizou sementes artificiais contendo a proteína arcelina. Nesse trabalho, a arcelina foi isolada da espécie selvagem *Lablab purpureus* (Linn.) Sweet, e incorporada como dieta artificial, em formato de sementes, e com concentrações diferentes (0,02% a 0,08%). Os indivíduos tratados com essas sementes artificiais apresentaram um aumento no período de desenvolvimento quando a concentração da proteína se encontrava a 0,02% w/w até 0,06% w/w (JANARTHANAN; SURESH, 2010). No entanto, o trabalho revelou que não houve correlação com o número de ovos e a concentração da Arcelina na dieta, pois até 0,4% w/w não houve modificação na oviposição, e que após a concentração de 0,08% w/w da proteína, nenhum adulto emergiu (JANARTHANAN; SURESH, 2010).

Pelo resultado da análise de proteínas *Western blot* deste trabalho, Figura 15, observa-se uma baixa expressão da proteína arcelina-1 na L5, e esse nível

concentração pode ser um dos fatores para o inseto apresentar uma resistência moderada à proteína arcelina.

Para avaliar a variável resposta *emergência dos insetos* foi realizado o mesmo procedimento da avaliação da oviposição. Tomou-se a média das três repetições e, desta forma, obteve-se uma amostra de cinco valores da média da *emergência dos insetos* nos grãos não transgênicos e outra amostra de cinco valores da média da *emergência dos insetos* nos grãos transgênicos (Figura 19).



**Figura 19.** Emergência média de gerações dos *C. maculatus* ao longo dos bioensaios.

Em seguida foi realizado o teste *t* cujas hipóteses estatísticas são as seguintes:

$H_0$ : o percentual de *emergência dos insetos* das sementes transgênicas (L5) e não transgênicas (controle) são iguais;

$H_1$ : o percentual de *emergência dos insetos* das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são diferentes.

O bioensaio realizado com controle x L5 teve como resultado obtido do teste o valor  $t = 2,91$  equivalendo ao  $p\text{-valor} = 0.019$ . Desta forma o teste foi significativo ao nível  $= 0.01$  e, assim, rejeitou-se a hipótese  $H_0$ , aceitando-se a hipótese  $H_1$ , a qual traz que o percentual de *emergência dos insetos* das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são diferentes.

No quinto bioensaio do controle x L5, a emergência teve uma média de 93 insetos por réplica no controle, com 77% dos ovos viáveis, e de 64 insetos emergidos (média) por réplica na L5, com 74% dos ovos viáveis. Mesmo sem apresentar diferença entre a oviposição, a emergência, fator importante para mostrar o efeito biocida da proteína arcelina-1 (JANARTHANAN *et al.*, 2012), diminuiu ao longo dos bioensaios, mostrando que este bruquídeo é moderadamente resistente à presença da proteína na semente.

Em relação ao bioensaio realizado com o controle x L3, resultado obtido do teste foi o valor  $t = 0,52$  equivalendo ao  $p$ -valor = 0.61, com esse resultado rejeitou-se a hipótese  $H_0$ . Este resultado pode ter sido devido ao primeiro bioensaio entre a L3 e o controle, no qual a emergência dos insetos na linhagem transgênica foi muito superior ao controle.

Confirmando esse fato, no primeiro bioensaio da L3 nasceram em torno de 104 insetos por réplica, caindo no quinto bioensaio para a média de 51 insetos por réplica e com 40% de ovos viáveis, enquanto que no controle a média de insetos foi inicialmente de 79 insetos por réplica no primeiro bioensaio, aumentando no quinto bioensaio para 73 insetos por réplica, com 45% de ovos viáveis. Com o prolongamento do bioensaio, houve uma diminuição da viabilidade dos ovos e emergência dos adultos na L3 nas populações dos insetos.

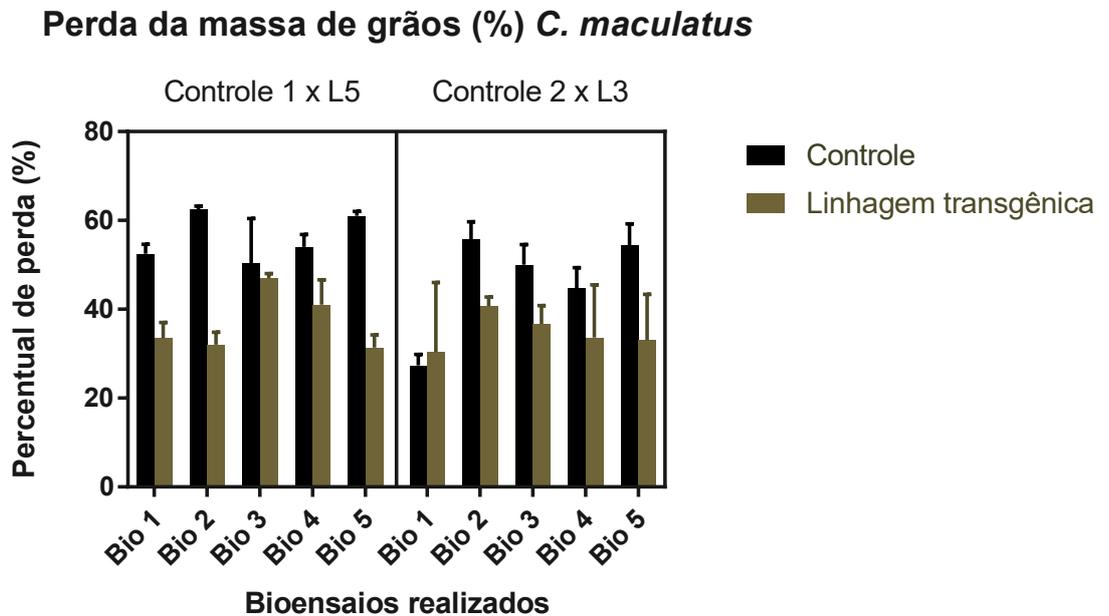
Na literatura tem-se que a concentração da arcelina até o valor de 0,04 (w/w) na semente existe uma diminuição da emergência do *C. maculatus*, no entanto, na concentração de 0,06 (w/w) a emergência dos insetos aumenta com o aumento da concentração da proteína (Figura 9) (JANARTHANAN *et al.*, 2012). Nesta análise o bruquídeo mostra uma resistência maior a uma mudança de concentração de proteína.

Pelos resultados das análises de proteínas neste trabalho, a L3 apresenta uma expressão maior da arcelina-1, enquanto que na L5 ocorre uma expressão menor desta proteína, no entanto por não ter sido realizada uma análise da concentração dessas proteínas, não se pode afirmar que a concentração da proteína esteja sendo um fator para que o inseto torna-se mais resistente no bioensaio com L3, mas pode ser um fator a ser analisado.

Para avaliar a variável resposta perda de massa de grãos foi realizado o mesmo procedimento da avaliação da oviposição. Tomou-se a média das três repetições e, desta forma, obteve-se uma amostra de cinco valores da perda média

de massa de grãos no bioensaio com sementes da linhagem transgênica e cinco valores no bioensaio com sementes não transgênicas.

Na figura 20, observa-se o registro da perda média de massa de grãos (em %) para os cinco bioensaios.



**Figura 20.** Perda média da massa dos grãos nos cinco bioensaios após a emergência de gerações dos *C. maculatus* ao longo dos bioensaios.

Em seguida foi realizado o teste t cujas hipóteses estatísticas são as seguintes:

$H_0$ : o percentual de *perda massa de grãos* das sementes transgênicas (L5) e não transgênicas (controle) são iguais;

$H_1$ : o percentual de *perda massa de grãos* das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são diferentes.

O resultado do teste do bioensaio da L5 x controle foi o valor  $t = 4,924$  equivalendo ao  $p$ -valor = 0.0012. Desta forma o teste foi significativo ao nível  $p = 0.0002$  e, assim, aceitou-se a hipótese  $H_1$ . A perda média de grãos foi de aproximadamente 18,83% menor na amostra de grãos transgênicos em comparação com a amostra de grãos não transgênicos. Essa diminuição ocorre porque com uma menor emergência, menos massa dos grãos será consumida para que as larvas desses insetos se desenvolvam e cheguem à fase adulta.

Para confirmar esse dado, a literatura traz que um fator que sugere resistência é o percentual de perda da massa dos grãos, porque durante o

desenvolvimento das larvas, estas consomem a massa dos grãos (BARBOSA *et al.*, 1999; MIRANDA; TOSCANO; FERNANDES, 2002). No bioensaio com L5 teve uma diminuição progressiva da emergência dos insetos, o que confirma a baixa perda da massa dos grãos nessa linhagem.

Um resultado similar foi encontrado quando analisou diferentes genótipos do feijão-caupi que poderiam apresentar resistência ao *C. maculatus*, encontrando essa resistência em genótipos que apresentaram uma diminuição da oviposição e/ou desenvolvimento das larvas ao longo das gerações, por um índice menor de massa seca consumida dos grãos (COSTA; BOIÇA JÚNIOR, 2004; MARSARO; VILARINHO, 2011)

No bioensaio da L3 x controle o valor obtido para  $t = 2,122$  equivalendo ao  $p\text{-valor} = 0,06$ , rejeitando-se a hipótese  $H_1$ . Apesar de não serem considerados diferentes em relação à perda das massas dos grãos, pode-se citar que no quarto bioensaio a média da perda da massa dos grãos no controle foi de 44%, enquanto que na L3 foi de 33%, uma diferença de 11% entre as amostras analisadas. E no quinto bioensaio, a média da perda da massa no controle aumentou para 55%, enquanto que na L3 mostrou-se estável com 33% de perda de massa.

Na L3 não houve uma diferença considerável na oviposição e na emergência dos insetos ao longo dos bioensaios, somente na perda da massa dos grãos, mostrando que o *C. maculatus* pode ser considerável resistente á essa linhagem.

No quinto bioensaio do *C. maculatus* e L5, houve a expulsão das larvas em duas réplicas do tratamento L5, o que não aconteceu no tratamento controle.

Na Figura 21, observa-se a expulsão das larvas (setas amarelas) do inseto durante a pesagem dos grãos do tratamento L5.



**Figura 21.** Adulto e larvas do *Callosobruchus maculatus* no quinto bioensaio do tratamento L5. Setas amarelas indicam as larvas que saíram dos grãos da L5, possivelmente devido ao efeito biocida da proteína.

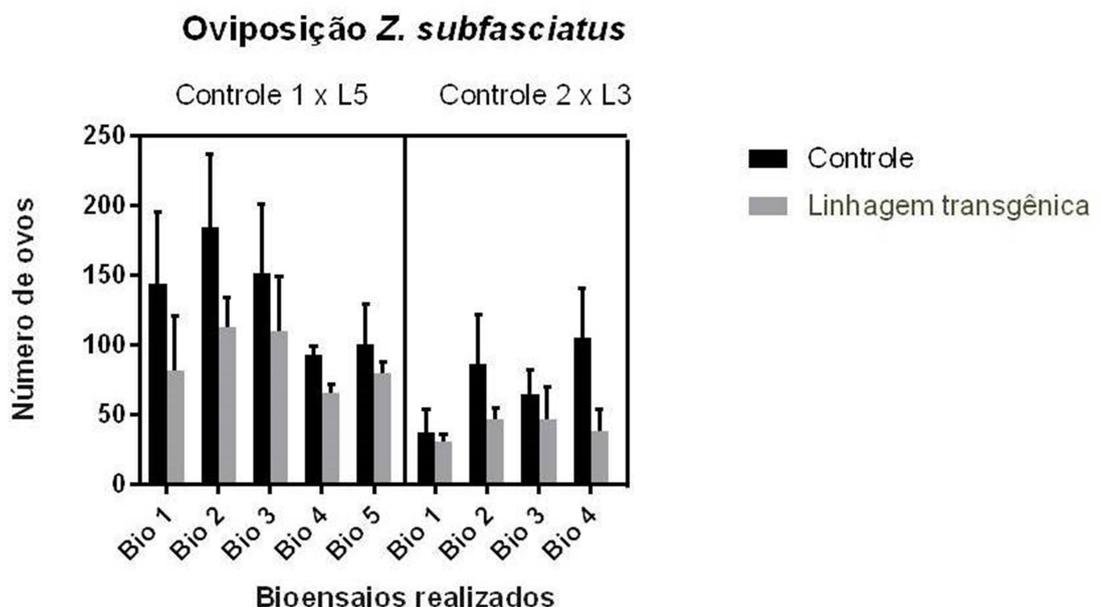
A proteína, como mencionado, está sendo expressa em baixa concentração na L5, no entanto, algumas larvas não se desenvolveram nos grãos, ou seja, não emergiram como bruquídeo adulto, e esse fato, de acordo com a literatura, ocorre pela presença da arcelina na semente (PAES *et al.*, 2000; ZAUGG *et al.*, 2013).

### 7.9 Bioensaio com *Zabrotes subfasciatus*

A metodologia aplicada no bioensaio do *Z. subfasciatus*, foi a mesma descrita no bioensaio do *C. maculatus*, com os insetos recém emergidos no Prédio de Controle de Animais, sexados, separados em casais e utilizados nas réplicas com as sementes a serem analisadas.

Para avaliar a variável resposta oviposição dos insetos foi feito o seguinte procedimento: Foram realizados cinco bioensaios e a bioensaio consistiu de três repetições com sementes não transgênicas (controle) e outras três repetições com sementes transgênicas (L5 ou L3). Tomou-se a média da oviposição nas três repetições e, desta forma, obteve-se uma amostra de cinco valores de oviposição nos grãos não transgênicos e outra amostra de cinco valores de oviposição nos grãos transgênicos.

Na Figura 22, tem-se o resultado da oviposição do *Z. subfasciatus* nos bioensaios.



**Figura 22.** Oviposição do *Z. subfasciatus* nos bioensaios. No bioensaio Controle 2 x L3, não houve emergência de insetos suficientes no quarto bioensaio para dar continuidade ao quinto bioensaio.

Em seguida foi realizado o teste *t* cujas hipóteses estatísticas são as seguintes:

H<sub>0</sub>: o percentual de que a oviposição *dos insetos* das sementes transgênicas (L5) e não transgênicas (controle) são iguais;

H<sub>1</sub>: o percentual de que a oviposição *dos insetos* das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são diferentes.

O resultado do bioensaio entre controle e L5 obteve o valor  $t = 2.329$  equivalendo ao  $p\text{-valor} = 0.04$ . Desta forma o teste foi significativo ao nível  $= 0.04$  e, assim, rejeitou-se a hipótese H<sub>0</sub>, aceitando-se a hipótese H<sub>1</sub>. De acordo com essa hipótese, observa-se a diferença na oviposição dos insetos nos grãos transgênicos que foi de aproximadamente 49% menor do que nos grãos não transgênicos.

Esse efeito biocida observado da arcelina no bruquídeo, com a redução de ovos produzidos, está de acordo com o observado por Barbosa *et al* (BARBOSA *et al.*, 1999), no qual a presença da proteína foi reduzindo a oviposição nas gerações subsequentes dos insetos.

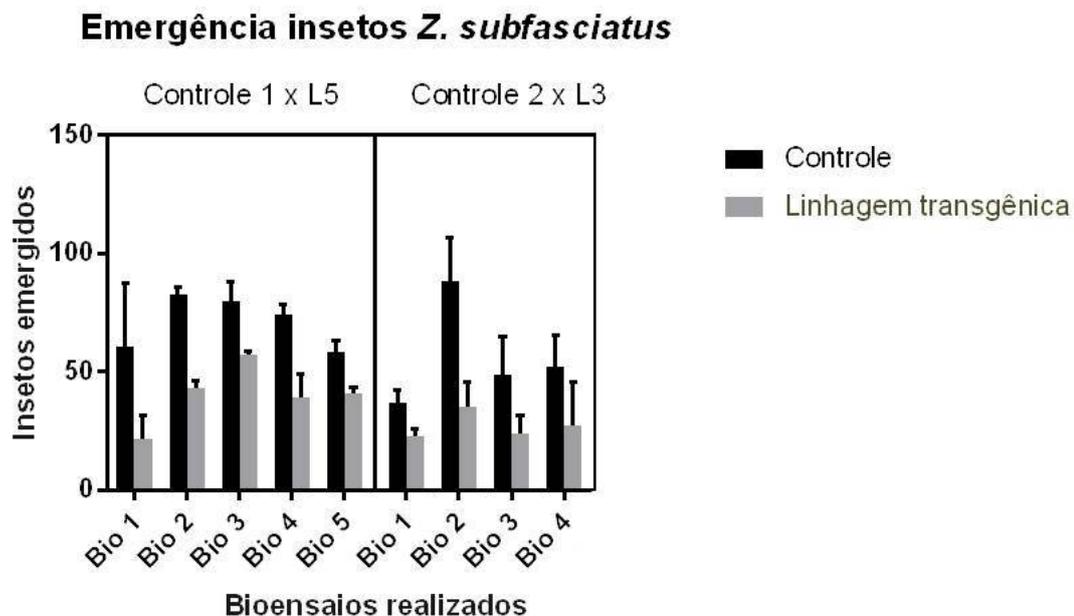
A oviposição entre o bioensaio realizado com controle e L3 teve como resultado o valor  $t = 3.007$ , equivalendo ao  $p\text{-valor} = 0.01$ . Desta forma, aceitou-se a hipótese H<sub>1</sub>, na qual a oviposição dos insetos nas sementes transgênicas e controle são diferentes. A oviposição dos insetos nos grãos transgênicos foi de aproximadamente 70% menor do que nos grãos não transgênicos. Como já relatado, por não ter ocorrido emergência de insetos no bioensaio com L3 até 24 horas após a emergência dos insetos no tratamento controle (Figura 23), o quinto bioensaio foi descartado.

No bioensaio com *Z. subfasciatus* houve diferença significativa entre as linhagens 3 e 5 em relação à oviposição nas quatro gerações estudadas, como observado no Figura 22, com a L3 apresentando uma oviposição menor em relação ao controle, quando se compara ao bioensaio realizado com a L5 x controle.

Em relação a esse fato, observa-se que no quarto e no quinto bioensaio da L5 x controle, houve um aumento na oviposição e na emergência dos adultos (Figura 23), e esse resultado pode ser um indicativo que em baixas concentrações da arcelina na linhagem transgênica o bruquídeo *Z. subfasciatus* mostra uma maior tolerância do que em concentrações maiores dessa proteína, como ocorreu na L3. Fato esse contrário ao encontrado com o *C. maculatus*.

Ao final dos bioensaios com as linhagens transgênicas e os controles, obteve-se a média de oviposição por fêmea entre 5 a 11 ovos, valores semelhantes aos relatados na literatura, os quais trazem que as fêmeas *do Z. subfasciatus* podem depositar entre 5 a 20 ovos em até 4 dias de teste (BARBOSA ET AL. 1999; MAZZONETTO, F. VENDRAMIM 2002), mostrando que os bioensaios não afetaram a biologia dos bruquídeos estudados.

Para avaliar a variável resposta emergência dos insetos (Figura 23) foi realizado o mesmo procedimento utilizado na *oviposição*. Tomou-se a média da emergência dos insetos nas três repetições e, desta forma, obteve-se uma amostra de cinco seis valores da emergência dos insetos nos grãos não transgênicos e outra amostra de cinco valores da emergência dos insetos nos grãos transgênicos.



**Figura 23.** Emergência média dos *Z. subfasciatus*. ao longo dos bioensaios no controle e no tratamento com as linhagens transgênicas 5 e 3.

Em seguida foi realizado o teste *t* cujas hipóteses estatísticas são as seguintes:

$H_0$ : o percentual de que a *emergência dos insetos* das sementes transgênicas (L5) e não transgênicas (controle) são iguais;

$H_1$ : o percentual de que a emergência dos insetos grãos das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são diferentes.

Como resultado do bioensaio entre controle e L5 foi obtido o valor  $t = 4.061$  equivalendo ao  $p$ -valor = 0.003. Desta forma o teste foi significativo ao nível = 0.003 e, assim, rejeitou-se a hipótese  $H_0$ , aceitando-se a hipótese  $H_1$ . Apesar da oviposição ter se mantido estável no quarto e no quinto bioensaio na L5, a emergência dos insetos nos grãos transgênicos foi de aproximadamente 28% menor do que nos grãos do tratamento controle, mostrando que os ovos foram mais viáveis no controle do que na linhagem transgênica.

No bioensaio entre L3 e controle o resultado do teste teve como valor  $t = 2.695$ , equivalendo ao  $p$ -valor = 0.04. Com o resultado, foi aceito a hipótese  $H_1$ , a qual relata que o percentual de emergência entre os insetos são diferentes. No quarto bioensaio, não houve um número suficiente de bruquídeos para dar continuidade ao quinto bioensaio, com a emergência de 2 casais em uma réplica e de 4 fêmeas e um macho em outra réplica na L3, enquanto que no controle, após 24 horas, todos os casais necessários para se dar continuidade ao bioensaio já tinha emergido. Após 72 horas, outros bruquídeos emergiriam na L3, no entanto, muitas horas já haviam decorrido desde a emergência dos primeiros *Z. subfasciatus* em réplicas do controle negativo. Desta forma, não houve continuidade ao quinto bioensaio.

A diminuição da oviposição em conjunto com a diminuição da emergência dos adultos é um dos fatores indicativos da resistência do feijão ao bruquídeo (OSBORN *et al.*, 1988; ZAUGG *et al.*, 2013).

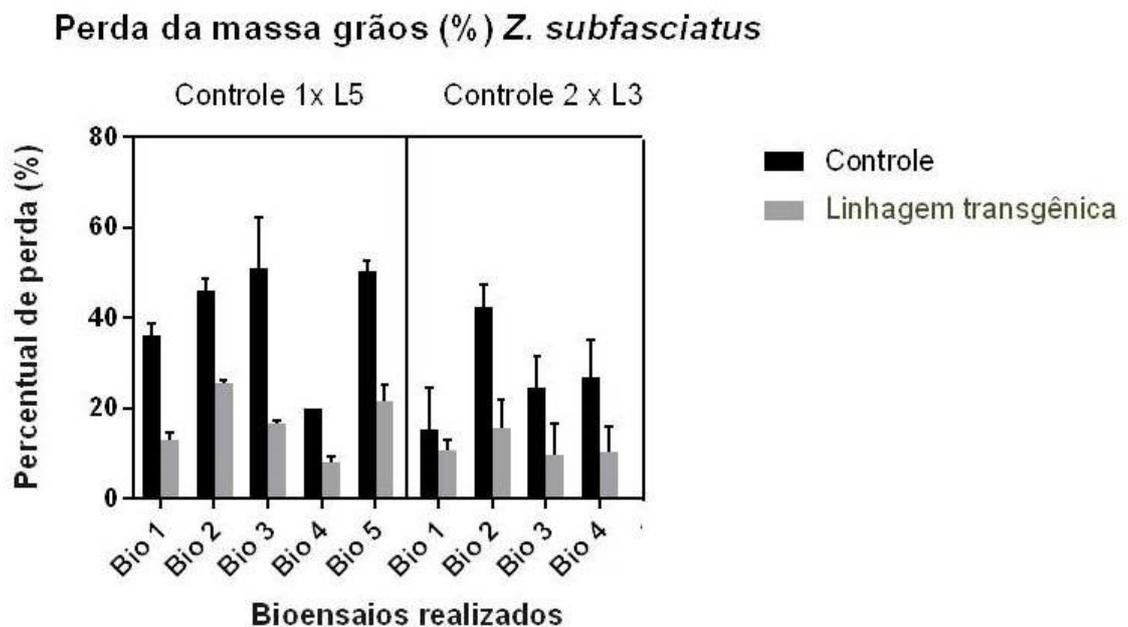
Com relação à baixa emergência dos adultos, a literatura traz que as proteínas arcelinas mostram ter atividade inibitória para o *Z. subfasciatus*, levando ao prolongamento do estágio larval e na redução do adulto emergente (PAES *et al.*, 2000; ZAUGG *et al.*, 2013). E, dependendo da variante da *Arcelina*, os níveis de resistência do feijão a infestação do inseto ocorre de maneira diferente, com *Arc1* sendo associado à resistência ao inseto *Z. subfasciatus* e, *Arc4* associado à resistência aos insetos *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; ZAUGG *et al.*, 2013)

Houve diferença entre o controle e as linhagens transgênicas, com uma redução na emergência dos adultos, a qual foi mantida nos cinco bioensaios realizados. Esse mesmo resultado foi observado por outros autores analisando a presença da proteína arcelina-1 e o efeito biocida ao *Z. subfasciatus* (BARBOSA *et al.*, 1999; ZAMBRE *et al.*, 2005). Outros autores, além disso, relatam que,

dependendo do inseto analisado, a redução dos adultos emergentes em linhagens contendo arcelina pode ser de até 90% em relação ao controle (BARBOSA *et al.*, 1999).

Para avaliar a variável resposta da *perda da massa dos grãos* foi realizado o mesmo procedimento das análises da oviposição. Tomou-se a média das três repetições e, desta forma, obteve-se uma amostra de cinco valores de perda média de massa de grãos com grãos não transgênicos e outra amostra de cinco valores de perda média de massa de grãos com grãos transgênicos.

Na Figura 24 observa-se o registro da perda média de massa de grãos (em %) para os bioensaios.



**Figura 24.** Perda média da massa dos grãos nos cinco bioensaios. No controle observa-se uma maior perda da massa do grão.

Em seguida foi realizado o teste *t* cujas hipóteses estatísticas são as seguintes:

$H_0$ : o percentual de *perda da massa dos grãos* das sementes transgênicas (L5) e não transgênicas (controle) são iguais.

$H_1$ : o percentual de *perda da massa dos grãos* das sementes transgênicas e não transgênicas (controle) são diferentes.

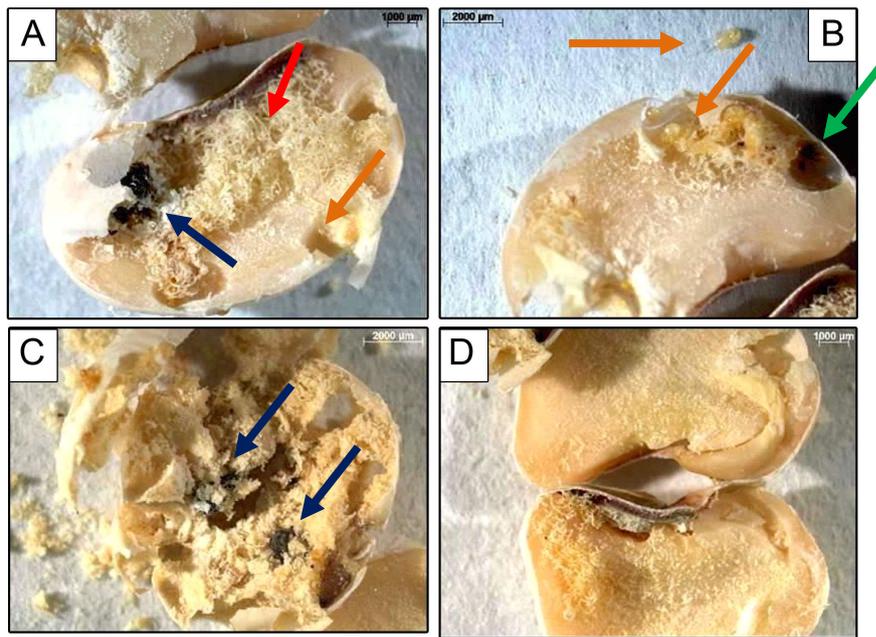
Como resultado do teste entre o controle e a L5 foi obtido o valor  $t = 3.599$  equivalendo ao  $p$ -valor = 0.007. Desta forma o teste foi significativo ao nível = 0.008

e, assim, rejeitou-se a hipótese  $H_0$ , aceitando-se a hipótese  $H_1$ . A perda média de grãos foi de aproximadamente 22%, menor nos grãos transgênicos do que nos grãos não transgênicos. A diminuição de oviposição também está relacionada com a baixa perda da massa dos grãos e na diminuição da emergência dos insetos observados nos bioensaios do *Z. subfasciatus*, Figuras 23 e 24.

O resultado do teste entre a L3 e o controle obteve o valor  $t= 2.695$ , equivalendo ao  $p\text{-valor}= 0.03$ . Com este resultado, rejeita-se a hipótese  $H_0$  e aceitando-se a hipótese  $H_1$ , a qual aceita que a perda da massa entre os grãos das sementes transgênicas e não transgênicas são diferentes. Neste caso, a diminuição da emergência dos adultos foi o fator responsável pela manutenção do peso das sementes, pois estas não foram infestadas e assim, não houve consumo pelas larvas durante o seu desenvolvimento da massa dos grãos. Como não houve continuidade ao quinto bioensaio, não existe

No terceiro bioensaio entre a L5 e o controle, Figura 24, mostra uma perda de massa de grão baixa quando comparada ao controle. Essa constância no peso das sementes pode ser explicada pela presença de sementes transgênicas que foram ovipositadas e que não ocorreu o desenvolvimento dos insetos, um dos fatores que caracterizam resistência ao ataque do inseto (LIOI *et al.*, 2003; PAES *et al.*, 2000). Foram 2 sementes em cada réplica na qual a emergência dos adultos foi nula. Desta forma, não houve uma perda da massa dos grãos devido ao consumo pelas larvas na semente infestada.

Na Figura 25 está sendo mostrada a qualidade das sementes após serem infestadas pelo bruquídeo *Z. subfasciatus*. As letras A e B retratam a quantidade de pupas que não se desenvolveram (seta laranja), mostrando a viabilidade dos ovos, além do acúmulo de fezes do animal, deixando a semente imprópria para o consumo.



**Figura 25.** Sementes infestadas pelo *Z. subfasciatus*. Letras A, B e C são sementes não transformadas e colonizadas pelo bruquídeo. Setas laranjas mostram as pupas e a seta vermelha a devastação na semente causada pelo *Z. subfasciatus*. Setas azuis mostram bruquídeos adultos desenvolvidos na semente controle. Seta verde – fezes dos animais. Letra D semente da L3, com poucas galerias formadas e com uma menor perda do grão.

A seta vermelha na letra C mostra uma larva que não se desenvolveu na semente não transgênica. Na letra C observa-se a perda da massa da semente, e a massa restante em formato esponjoso, bem como os orifícios feitos pelos insetos, com insetos adultos presos nas sementes.

Na letra D, tem-se a imagem de uma semente pertencente a L3, a qual teve oviposição e a saída de animal adulto. Nesta imagem pode-se observar que houve uma menor perda na massa em relação à semente não transgênica infestada pelo *Z. subfasciatus*.

## 8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A resistência da planta aos insetos tem como um dos resultados a diminuição do número de ovos e da emergência dos adultos. No entanto, alguns predadores se mostram imunes aos compostos de defesa produzidos pela planta, como no caso de proteínas de reserva Fitohemaglutinina que não é tóxica para o *C. maculatus* e o *Z. subfasciatus*. Da mesma forma, outros compostos químicos produzidos pelo feijão-caupi como taninos não são tóxicos para esses bruquídeos e o inibidor de  $\alpha$ -amilase mostrou-se tóxico somente para o *C. maculatus*.

O gene da *Arcelina* está relacionado à antibiose do caruncho *Z. subfasciatus* e do *Acanthoscelides obtectus*, e a introdução desse gene no feijão-caupi poderia ser uma forma de diminuir o ataque de carunchos ao feijão. No entanto, esse gene encontrado na natureza é expresso em conjunto com outras proteínas, o que contribui na antibiose do caruncho.

Ao ser introduzido no feijão-caupi, esse gene quando presente apresentou uma baixa expressão da sua proteína, o que foi observado nas análises por *Dot blot*, Western blot e ELISA na L5 e uma expressão mais forte na L3.

Ao serem desafiados os insetos em bioensaios com sementes de linhagens transgênicas, o *Z. subfasciatus* mostrou ser sensível a proteína expressa indiferente à sua concentração, enquanto que o *Callosobruchus maculatus* mostrou ter uma tolerância moderada a presença dessa proteína na semente.

Em trabalhos anteriores utilizando a proteína arcelina no intuito de conferir resistência da semente ao inseto *C. maculatus*, a antibiose conferida ao inseto dependeria diretamente da concentração dessa proteína na semente. Somente em concentrações maiores o animal não conseguiria se desenvolver. Motivo como atua a proteína arcelina no desenvolvimento do *C. maculatus* ainda é desconhecido.

Apesar da baixa concentração da arcelina encontrada, as sementes da L5 apresentaram uma resistência ao ataque do *C. maculatus*, quando comparada ao controle. Os resultados demonstraram que houve uma diferença significativa na oviposição, na emergência da população dos insetos e na perda da massa dos grãos, as quais foram menores nessa linhagem transgênica.

No entanto, na L3, onde por análises de proteína obteve-se uma concentração maior da proteína expressa, não houve uma diferença entre o controle e a linhagem transgênica. O desenvolvimento do bruquídeo começou a diminuir a

partir do quarto bioensaio, no entanto, não houve diferença significativa que considerasse esse resultado como de resistência. Como não foram quantificadas as proteínas expressas na L5 e na L3, não se pode afirmar qual foi o motivo do bruquídeo mostrar-se resistente em uma linhagem onde a expressão da arcelina mostrou ser mais forte.

Em relação ao *Z. subfasciatus*, tanto na L5, quanto na L3, esse bruquídeo mostrou ser sensível a presença da proteína arcelina nas sementes, indiferente a sua concentração. A partir do segundo bioensaio houve redução da oviposição, emergência dos insetos e também da porcentagem da perda da massa dos grãos.

No bioensaio realizado com a L3, nos últimos ensaios algumas sementes utilizadas foram testadas quanto à presença da proteína arcelina, após a oviposição sem emergência do adulto, obtendo um resultado positivo para esta análise. Com esta linhagem, a oviposição dos animais a partir do terceiro bioensaio começou a diminuir, e no quarto bioensaio, poucos casais emergiriam para dar continuidade a esse ensaio.

Apesar de mostrar resistência a infestação pelos bruquídeos, as linhagens transgênicas, L5 e L3, não se mostraram eficazes para o controle do *C. maculatus*. E somente a partir da quarta geração, os *Z. subfasciatus* diminuíram sua emergência ao ponto de não se poder dar continuidade aos bioensaios, principalmente na L3. Enquanto que no controle houve uma diminuição normal da população desses bruquídeos devido ao próprio sistema de endogamia que existe em um confinamento de animais por longos períodos.

O interessante seria que a partir da segunda geração não houvesse mais o aparecimento dos animais e para isso ocorrer, a proteína poderia estar sendo expressa em uma concentração maior, ou mesmo, ter outros genes inseridos no feijão no intuito de obter uma resposta mais plausível para os resultados desejados.

Uma alternativa seria o uso do gene da *Arc-4* reconhecido por apresentar uma resistência do tipo antibiose a dois carunchos, o *Z. subfasciatus* e o *A. obtectus*, do mesmo modo, tem-se o gene *Arc-8*, encontrado há pouco tempo no feijão comum e que apresenta uma antibiose de igual importância contra os carunchos citados. Esses genes inseridos de forma unitária ou em conjunto, poderia resultar em um feijão mais resistência à infestação dos bruquídeos, possivelmente, desde o aparecimento da primeira geração.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, E. F. *et al.* Diversity among isolates of cowpea *severe mosaic virus* infecting cowpeas in northeastern Brazil. *Genetics and molecular research: GMR*, v. 11, n. 3, p. 3146–3153, 2012.
- ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. DE. Proposta de Liberação Comercial de Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico. v. 1, p. 504, 2010.
- BA, F. S. *et al.* Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* ( L .) Walp .] as revealed by RAPD markers. p. 539–550, 2004.
- BALDIN, E. L. L.; PEREIRA, J. M. Resistência de genótipos de feijoeiro. *Ciência Agronômica*, v. 34, p. 1507–1513, 2010.
- BARBOSA, F. *et al.* Efeito da Proteína Arcelina na Biologia. n. Boheman 1833, p. 1805–1810, 1999.
- BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. DOS. Boletim de Pesquisa. Embrapa-CNPAT., p. 1–22, 2007.
- BIFANO, T. D. *et al.* Host-mediated induction of  $\alpha$ -amylases by larvae of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) is irreversible and observed from the initiation of the feeding period. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 74, n. 4, p. 247–260, 2010.
- BLAIR, M. W. *et al.* Linkage disequilibrium at the APA insecticidal seed protein locus of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC plant biology*, v. 10, p. 79, 2010.
- BLAIR, M. W.; SOLER, A.; CORTÉS, A. J. Diversification and Population Structure in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.
- BRASILEIRO, A. C.; CARNEIRO, V. T. DE C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília/DF: [s.n.].

- BURLE, M. L. *et al.* Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 121, n. 5, p. 801–813, 2010.
- CAETANO, P. *et al.* Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 64. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento., v. 210, p. 1676–1340, 2007.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, n. 11, p. 1515–1539, 2002.
- CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant cell*, v. 3, n. 1, p. 1–9, 1991.
- CITADIN, C. T. *et al.* Genetic engineering in Cowpea (*Vigna unguiculata*): History, status and prospects. *GM Crops*, v. 2, n. 3, p. 144–149, 2012.
- COPE, J. M.; FOX, C. W. Oviposition decisions in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): Effects of seed size on superparasitism. *Journal of Stored Products Research*, v. 39, n. 4, p. 355–365, 2003.
- CORDEIRO, T. *et al.* Molecular modeling of Arcelin-5c from bean seeds and determination of its solution state. *Protein and Peptide Letters*, p. 249–256, 2000.
- CORREA, C. P. *et al.* Sobrevivência e fecundidade de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) em baixa temperatura e sua correlação com a ingestão de carboidrato. p. 1–6, 2015.
- COSTA, N. P. DA.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Efeito de Genótipos de Caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., Sobre o Desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). n. February, p. 77–83, 2004.

- D'SILVA, I.; HEATH, M. C. Purification and Characterization of Two Novel Hypersensitive Response-inducing Specific Elicitors Produced by the Cowpea Rust Fungus \* Icy D ' Silva and Miche. v. 272, n. 7, p. 3924–3927, 1997.
- DAMASCENO, K. Feijão tolerante à seca. Boletim de Pesquisa. Embrapa-CNPAT.,v.1, n. 2, p. 1–07, 2015.
- DECHECCO E., A.; ORTIZ, P. Influencia de la temperatura sobre el “gorgojo del frijol” *Zabrotes subfasciatus*. Rev. per. Ent., , 1988.
- DIOUF, D. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* ( L .) Walp .] “ omics ” research for genetic improvement. v. 10, n. 15, p. 2803–2810, 2011.
- DUARTE, J. Um sistema e um feijão transgênico para enfrentar o mosaico dourado. Brasília/DF: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8534579/um-sistema-e-um--feijao-transgenico-para-enfrentar-o-mosaico-dourado>>.
- DUTRA, L. B.; RODRIGUES, C. Protocolos Otimizados para Arranjos de Clones e Minipreparação de DNA 23. [s.l: s.n.].
- EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Field Crops Research, v. 53, n. 1–3, p. 187–204, 1997.
- ETZLER, M.; SUROLIA, A.; CUMMINGS, R. L-type Lectins. In: In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. [s.l: s.n.]. p. Chapter 29.
- FABRE, C. *et al.* Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-2) seeds. Biochemical Journal, v. 329, n. October 2016, p. 551–560, 1998a.

- FABRE, C. *et al.* Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-2) seeds. v. 560, p. 551–560, 1998b.
- FATOKUN, C. A *et al.* Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production. Proceedings of the World Cowpea Conference III held at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), p. 7–396, 2002.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. v. 5, p. 213–255, 2005.
- FROTA, K. DE M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp ), cultivar BRS-Milênio. [Chemical composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), BRS-Milênio cultivar]. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 2007, n. 2565, p. 470–476, 2008.
- GOOSSENS, A. *et al.* Isolation and characterisation of arcelin-5 proteins and cDNAs. v. 795, p. 787–795, 1994.
- GROSSI DE SA, M. F. *et al.* Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta*, v. 203, n. 3, p. 295–303, 1997.
- HOWE, R.; CURRIE, J. Some laboratory observation on the rates of development, mortality and oviposition of several species of bruchidae breeding in stored pulses. *Bulletin of entomological Research*, v. 55, p. 437–477, 1964.
- HUESING, J. E. *et al.*  $\alpha$ -Amylase Inhibitor , not Phytohemagglutinin , Explains Resistance of Common Bean Seeds to Cowpea Weevil. p. 993–996, 1991.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>.
- IVO, N. L. *et al.* Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna*

- unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant cell reports*, v. 27, n. 9, p. 1475–83, 2008.
- JANARTHANAN, S. *et al.* A new variant of antimetabolic protein, arcelin from an Indian bean, *Lablab purpureus* (Linn.) and its effect on the stored product pest, *Callosobruchus maculatus*. *Food Chemistry*, v. 135, n. 4, p. 2839–2844, 2012.
- JANARTHANAN, S.; SURESH, P. Insecticidal potential of wild bean seed protein , arcelin. v. 2, n. October 2003, p. 243–245, 2010.
- KUSOLWA, P. M. .; MYERS, J. R. Seed storage protein Arl2 and its variants from the apalocus of wild terapy ben G40199 confers resistance to *Acanthocellides obtectus* when expressed in common beans. v. 19, n. 4, p. 255–265, 2011.
- LAZZARI, F. N. *Control of Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera , Chrysomelidae , Bruchinae ) in *Phaseolus vulgaris* Linnaeus , using diatomaceous earth under different temperatures. n. October, p. 804–810, 2015.
- LIMA, J. A. A. *et al.* *Crotalaria paulinea* , Novo Hospedeiro Natural do Vírus do Mosaico Severo do Caupi. v. 30, n. 4, p. 429–433, 2005.
- LIMA, M. P. L. DE.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R. T. J. B. Identificação de Genótipos de Caupi *Vigna unguiculata* (L .) Walp . Resistentes a *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae). *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 2, p. 289–295, 2001.
- LIOI, L. *et al.* Lectin-related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 107, n. 5, p. 814–822, 2003.
- LIOI, L. *et al.* Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 53, n. 8, p. 1615–1623,

2006.

- MARSARO, A. L. J.; VILARINHO, A. A. Resistência de cultivares de feijão-caupi ao ataque de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em condições de armazenamento. Ciências Agrárias e Ambientais, p. 51–55, 2011.
- MBOGO K.P., DAVIS J., M. J. R. Transfer of the Arcelin-Phytohemmagglutinin- $\alpha$  Amylase inhibitor seed protein locus from tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) to common bean (*P. vulgaris* L.), 2009. Disponível em: <<http://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2009.285.295>>
- MESQUITA, R. *et al.* Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade proteica. Ciência e Agrotecnologia, v. 31, p. 1114–1121, 2007.
- MIKLAS, P. N. *et al.* Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. Euphytica, v. 147, n. 1–2, p. 105–131, 2006.
- MIRANDA, J. E.; TOSCANO, L.; FERNANDES, M. Avaliação da Resistência de Diferentes Genótipos de *Phaseolus vulgaris* à *Zabrotes subfasciatus* (Boh .) (Coleoptera : Bruchidae ). v. 28, p. 571–576, 2002.
- MITCHELL, R. The Evolution of Oviposition Tactics in the Bean Weevil , *Callosobruchus maculatus* ( F .) Author ( s ): Rodger Mitchell Reviewed work (s): Published by: Ecological Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1935504> . The Evolution of O. Ecology, v. 56, n. 3, p. 696–702, 2012.
- MOUREY, L. *et al.* Crystal structure of the arcelin-1 dimer from *Phaseolus vulgaris* at 1.9- Å resolution. Journal of Biological Chemistry, v. 273, n. 21, p. 12914–

12922, 1998.

OLIVEIRA, G. P. D. E. MATURAÇÃO E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia., p. 100p., 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. *et al.* Técnicas de manejo para o cultivo do caupi em Roraima. Embrapa Roraima. Circular Técnica, 03, p. 19p, 2002.

OSBORN, T. *et al.* Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. Science (New York, N.Y.), v. 240, p. 207–210, 1988.

OSBORN, T. C. *et al.* Bean arcelin. Theoretical and Applied Genetics, v. 71, n. 6, p. 847–855, 1986.

PAES, N. S. *et al.* The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. Journal of Insect Physiology, v. 46, n. 4, p. 393–402, 2000.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; PEREIRA, P, R. V. D. S.; ZUKOVSKI, L. Desenvolvimento de *Zabrotes subfasciatus* (Boh .) (Coleoptera : Chrysomelidae , Bruchinae) em Genótipos de *Phaseolus vulgaris* L . Neotropical Entomology, n. August, p. 560–564, 2007.

ROCHA, M. D. R. *et al.* Feijão-Caupi. Biologia Floral. Teresina: Embrapa Meio-Norte., 2007.

SALES, M. P. *et al.* Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Plant physiology, v. 124, n. 2, p. 515–522, 2000.

SALES, M. P. *et al.* Performance of bean bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace 10) *Vigna unguiculata* seeds: Relationship with

- trypsin inhibitor and vicilin excretion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 142, n. 4, p. 422–426, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY, USA: [s.n.].
- SANTOS, A. A. DOS *et al.* Controle do mosaico do caupi (*Vigna sinensis* (L.) Savi) por resistencia varietal. [s.l: s.n.].
- SARI, L. T.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; PEREIRA, P. R. V. D. S. Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L., cv. Carioca (Fabaceae), sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 47, n. 4, p. 621–624, 2003.
- SAVALLI, U. M.; FOX, C. W. The effect of male size , age , and mating behavior on sexual selection in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Ethology Ecology and Evolution*, v. 11, n. October, p. 49–60, 1999.
- SILVA, C. P. *et al.* Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 29, n. 4, p. 355–366, 1999.
- SILVA, J. F. *et al.* Dados biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann , 1833 ) ( Coleoptera : Bruchidae ) em dois genótipos de *Phaseolus vulgaris* L . Biological data of *Zabrotes subfasciatus* ( Bohemann , 1833 ) ( Coleoptera : Bruchidae ) in two *Phaseolus vulgaris* L . geno. p. 4–7, 2013.
- SINIMBU, F. Feijão-caupi conquista mercado internacional. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2006738/feijao-caupi-conquista-mercado-internacional>>.

- SOUSA, I. DA S. *et al.* Determinação da taxa de fecundação cruzada em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.). p. 3–6, 2006.
- SPARVOLI, F. *et al.* Lectin and lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds: Biochemical and evolutionary studies. *Plant Molecular Biology*, v. 45, n. 5, p. 587–597, 2001.
- SPARVOLI, F.; BOLLINI, R. Arcelin in wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds: sequence of arcelin 6 shows it is a member of the arcelins 1 and 2 subfamily. p. 383–388, 1998.
- SPERANDIO, L. A. A.; ZUCOLOTO, F. S. Oviposition behavior of *Zabrotes subfasciatus* females (Coleoptera, Bruchidae) under conditions of host deprivation. *Iheringia. Série Zoologia*, v. 94, n. 3, p. 315–319, 2004.
- SPERANDIO, L. A. A.; ZUCOLOTO, F. S. Oviposition behavior of wild *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae) females deprived of the host *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae). *Iheringia. Série Zoologia*, v. 99, n. 4, p. 403–408, 2009.
- TIMKO, M. P. *et al.* Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. *BMC genomics*, v. 9, n. 62, p. 103, 2008.
- ZAMBRE, M. *et al.* A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (teparý bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 110, n. 5, p. 914–924, 2005.
- ZAUGG, I. *et al.* QUES, a new *Phaseolus vulgaris* genotype resistant to common bean weevils, contains the Arcelin-8 allele coding for new lectin-related variants. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 126, n. 3, p. 647–661, 2013.
- ZILLI, J. É. *et al.* Caracterização e avaliação da eficiência simbiótica de estirpes de

Bradyrhizobium em caupi nos solos de cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41(5), p. 811–818, 2006.