

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**MARIANA CRISTINA MORAES CORSO**

**Avaliação da eficiência de eventos transgênicos de soja que expressam JABURETOX na resistência a insetos-praga**

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**MARIANA CRISTINA MORAES CORSO**

**Avaliação da eficiência de eventos transgênicos de soja que expressam JABURETOX na resistência a insetos-praga**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Bodanese Zanettini**

**Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Ciliana Rechenmacher**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Biotecnologia Molecular na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PORTO ALEGRE

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Corso, Mariana Cristina Moraes

Avaliação da eficiência de eventos transgênicos de soja que expressam JABURETOX na resistência a insetos-praga / Mariana Cristina Moraes Corso. -- 2019.

43 f.

Orientadora: Maria Helena Bodanese Zanettini.

Coorientadora: Ciliana Rechenmacher.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. JABURETOX. 2. insetos-praga. 3. soja. 4. Helicoverpa armigera. 5. Spodoptera frugiperda. I. Zanettini, Maria Helena Bodanese, orient. II. Rechenmacher, Ciliana, coorient. III. Título.

**MARIANA CRISTINA MORAES CORSO**

**Avaliação da eficiência de eventos transgênicos de soja que expressam JABURETOX na resistência a insetos-praga**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Biotecnologia Molecular na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Comissão Examinadora:

---

Profª Drª Marcia Pinheiro Margis

---

Dr. Ricardo Luis Mayer Weber

---

Profª Drª Maria Helena Bodanese Zanettini

PORTO ALEGRE

2019

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras...

Maria Helena, agradeço por abrir gentilmente as portas do laboratório compartilhando seu vasto conhecimento, sempre me incentivando e contagiando com seu otimismo. Muito obrigada pela orientação, carinho, dedicação e muitas oportunidades;

Ciliana que, além de orientadora, se tornou uma grande amiga. Me acolheu com muito carinho e paciência, me explicou muito mais do que técnicas, me ensinou a desenvolver o olhar científico e crítico que a carreira exige. Obrigada por ter contribuído de maneira tão significativa para minha formação;

Aos colegas do laboratório de Genética Vegetal...

pelas conversas, companheirismo e ótimo ambiente de trabalho. Em especial, à Luisa, Giulia, Lariane, Ronei, Letícia e Fernanda pela ajuda, parceria e amizade;

À Beatriz, que delineou e executou brilhantemente a primeira fase do trabalho e, apesar da distância, continuou contribuindo ativamente para sua finalização;

À professora Márcia, agradeço pela disponibilidade e ajuda. Suas contribuições enriqueceram muito o trabalho;

À Dr<sup>a</sup> Célia R. Carlini e a sua equipe pelos trabalhos referentes ao JABURETOX que permitiram o desenvolvimento de tantos outros;

À Dr<sup>a</sup> Magali F. Grando e a sua equipe, da Universidade de Passo Fundo, pelo desenvolvimento do primeiro bioensaio;

À Dr<sup>a</sup> Luiza R. Redaelli, do Laboratório de Biologia, Ecologia e Controle Biológico de Insetos, por ter aberto as portas do laboratório possibilitando a realização de uma parte importante do trabalho...

particularmente ao Jucélio Duarte, pelo conhecimento compartilhado e participação ativa na realização do experimento, doando seu tempo para que o bioensaio fosse bem executado. Sua contribuição foi essencial para a qualidade dos resultados obtidos;

À UFRGS e todos os professores pelo ensino de excelência;

Aos meus colegas de graduação que deixaram a jornada mais leve;

À minha linda família, pelo amor incondicional, compreensão e apoio durante as diferentes fases da graduação...

sobretudo à minha mãe pelo cuidado, carinho e presença tão forte mesmo morando longe. Um exemplo incrível de resiliência, força e leveza;

e ao meu amor, pela presença, paciência e incentivo nos momentos mais críticos. Obrigada pelo carinho e por me fazer persistir nos dias difíceis

... essa conquista também é de vocês!

## RESUMO

Apesar do cenário mundial da soja ser bastante positivo, principalmente para o Brasil, estresses bióticos e abióticos como clima, pragas e doenças acarretam reduções significativas no desenvolvimento e produtividade das plantas. *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda* são espécies de insetos-praga que se alimentam de diferentes estruturas vegetais, especialmente inflorescências e frutos. Estes insetos têm surpreendido produtores e pesquisadores pelo seu grande poder de destruição. Dessa forma, empenhos que possibilitem a obtenção de plantas de soja mais resistentes a insetos-praga e que contribuam para o desenvolvimento de cultivares agronomicamente superiores, são de extrema importância.

O grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Célia R. Carlini demonstrou a atividade inseticida de uma urease de *Canavalia ensiformis* contra insetos. Nos estudos realizados foi identificada a região da proteína responsável pela toxicidade, posteriormente, denominada JABURETOX.

Em experimentos prévios, realizados por nossa equipe, culturas embriogênicas de soja foram submetidas à transformação, via bombardeamento, utilizando plasmídeos que continham a sequência gênica codificadora do peptídeo JABURETOX. Foram obtidas 174 plantas, oriundas de 76 eventos independentes de transformação. As plantas transformadas ( $T_0$ ) foram autofertilizadas para a obtenção das gerações  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ .

Visando avaliar a capacidade inseticida do peptídeo JABURETOX, dois bioensaios foram delineados. No primeiro, plantas da progênie  $T_2$  que expressavam JABURETOX, foram desafiadas com lagartas da espécie-praga *Helicoverpa armigera*. Os resultados mostraram que a expressão de JABURETOX conferiu às plantas de soja maior resistência a lagartas de *H. armigera*. Tendo em vista tais resultados, um segundo bioensaio foi realizado. Neste, folhas de plantas da progênie  $T_3$  foram desafiadas com lagartas de *S. frugiperda*. O efeito da expressão de JABURETOX na mortalidade destas lagartas foi pequeno ou inexistente. Os resultados sugerem uma atividade inseticida espécie-específica do peptídeo JABURETOX.

## ABSTRACT

Although the world scenario of soybeans is very positive, especially for Brazil, biotic and abiotic stresses such as climate, pests and diseases lead to significant reductions in plant development and productivity. *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera frugiperda* are species of insect pests that feed themselves on different plant structures, especially inflorescences and fruits. These insects have surprised producers and researchers for their great power of destruction. Therefore, efforts to obtain soybean plants that are more resistant to insect pests and that contribute to the development of agronomically superior cultivars are of extremely important.

The research group coordinated by Dr. Célia R. Carlini has demonstrated the insecticidal activity of a *Canavalia ensiformis* urease against insects. In the studies carried out the region of the protein responsible for toxicity, later known as JABURETOX, was identified.

In previous experiments performed by our team, embryogenic soybean cultures were subjected to a transformation via bombardment using plasmids that contained the coding sequence of a gene from the peptide JABURETOX. A total of 174 plants were obtained from 76 independent transformation events. The transformed plants ( $T_0$ ) were self-fertilized to obtain the  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$  generations.

In order to evaluate the insecticidal capacity of the JABURETOX peptide, two bioassays were delineated. In the first one, plants of the  $T_2$  progeny expressing JABURETOX were challenged with pest-caterpillars *H. armigera*. The results showed that the expression of JABURETOX conferred to the soybean plants greater resistance to *H. armigera* caterpillars. In view of such results, a second bioassay was performed. In this one, leaves of  $T_3$  progeny plants were challenged with *S. frugiperda* caterpillars. The effect of JABURETOX expression on the mortality of these caterpillars was small or non-existent. The results suggest a species-specific insecticidal activity of the peptide JABURETOX.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Reação de hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease.....	12
<b>Figura 2:</b> Comparação entre os domínios das ureases de diferentes organismos..	13
<b>Figura 3:</b> Construção de vetores.....	16
<b>Figura 4:</b> Transformação de soja via bombardeamento de partículas.....	17
<b>Figura 5:</b> Ciclo de vida lagarta <i>Helicoverpa armigera</i> .....	20
<b>Figura 6:</b> Lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> em folha de soja.....	21
<b>Figura 7:</b> Plantas da geração T <sub>3</sub> na sala de crescimento de soja.....	27
<b>Figura 8:</b> Etapas do ciclo de vida da <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	28
<b>Figura 9:</b> Expressão do JABURETOX em folhas de plantas transgênica.....	30
<b>Figura 10:</b> Mortalidade acumulada das lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	31
<b>Figura 11:</b> Distribuição da mortalidade média acumulada das lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	32
<b>Figura 12:</b> Percentual de lagartas que atingiram o 2 <sup>o</sup> , 3 <sup>o</sup> e 4 <sup>o</sup> instar .....	32
<b>Figura 13:</b> Consumo foliar de lagartas <i>Helicoverpa armigera</i> .....	33
<b>Figura 14:</b> Mortalidade acumulada das lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	35
<b>Figura 15:</b> Distribuição da mortalidade média acumulada das lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	35

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos iniciadores projetados para PCR e RT-qPCR.....	18
<b>Tabela 2:</b> Número de eventos e plantas transformadas confirmadas por PCR.....	19
<b>Tabela 3:</b> Efeito inseticida das plantas transgênicas (geração T <sub>1</sub> ).....	22
<b>Tabela 4:</b> Eventos e plantas utilizadas no bioensaio com a <i>Helicoverpa armigera</i> (geração T <sub>2</sub> ).....	30
<b>Tabela 5:</b> Eventos e plantas utilizadas no bioensaio com a <i>Spodoptera frugiperda</i> (geração T <sub>3</sub> ).....	34
<b>Tabela 6:</b> Eventos, pupas e viabilidade de pupas formadas por lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	36

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 SOJA.....	11
1.2 UREASES.....	12
1.2.1 UREASES EM PLANTAS .....	13
1.2.2 PAPEL DE DEFESA DAS UREASES.....	14
1.3 CONSTRUÇÃO DE VETORES.....	15
1.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....	16
1.5 ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T <sub>0</sub> e T <sub>1</sub> .....	17
1.6 INSETOS .....	19
1.6.1 LAGARTA <i>HELICOVERPA ARMIGERA</i> .....	19
1.6.2 LAGARTA <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	20
1.7 TESTE PILOTO .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4.1 ANÁLISES MOLECULARES DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T <sub>2</sub> E T <sub>3</sub> .....	25
4.2 BIOENSAIOS.....	25
4.2.1 BIOENSAIO <i>HELICOVERPA ARMIGERA</i> .....	25
4.2.2 BIOENSAIO LAGARTA <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	26
4.2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
5.1 ANÁLISES MOLECULARES DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T <sub>2</sub> .....	29
5.2 RESULTADOS BIOENSAIO LAGARTA <i>HELICOVERPA ARMIGERA</i> .....	31
5.3 ANÁLISES MOLECULARES DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T <sub>3</sub> .....	33
5.4 RESULTADOS BIOENSAIO LAGARTA <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	34
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], possui uma alta relevância agrônômica no âmbito mundial. Pertencente à família Fabaceae (Leguminosa), a soja realiza autofecundação e possui ciclo de vida anual. Seu cultivo teve início no nordeste da China, durante o século XI a.C. e se propagou pelo oriente nos séculos seguintes (Goellner et al. 2010).

A importância da cultura está vinculada a diferentes utilizações. Alimentação humana e animal, matéria prima para a produção de biocombustíveis e inoculante, devido a sua capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico através da simbiose com microrganismos, são alguns exemplos.

No Brasil, seu plantio em larga escala, só teve início em 1960 (Reetz et al. 2008). Entretanto, o país já alcança a marca de segundo maior produtor dessa leguminosa com estimativas indicando grande expansão. Na safra 2018/19, a área total cultivada foi estimada em 35,7 milhões de hectares, 1,7% superior ao cultivado em 2017/18 e 72,5% maior do que a safra 2006/07 (CONAB, 2019).

Apesar do cenário mundial ser bastante positivo, principalmente para o Brasil, diversos estresses bióticos e abióticos como clima, pragas e doenças acarretam reduções significativas no desenvolvimento e produtividade da soja, limitando a distribuição geográfica das culturas e acarretando reduções significativas no desenvolvimento e produtividade das plantas (Dita et al. 2006). pragas e doenças, que podem ocorrer durante todo o ciclo de vida da soja são os principais limitadores bióticos. As larvas de inseto de maior importância econômica são *Helicoverpa armigera*, *Anticarsia gemmatalis* (Lagarta-da-soja), *Pseudoplusia includens* (Lagarta-medede-palmo) *Epinotia aporema* (Broca-das-axilas) e *Spodoptera frugiperda* (Lagarta-militar).

A identificação de genes que possibilitem a obtenção de plantas de soja mais resistentes a insetos-praga pode contribuir para o desenvolvimento de cultivares agronomicamente superiores.

## 1.2 UREASES

As ureases são enzimas multifuncionais, com diferentes domínios de atividade (Carlini e Polacco, 2008). Em 1926, Sumner provou a origem proteica das enzimas ao cristalizar, pela primeira vez, a urease majoritária da semente de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) (Sumner, 1926). Já em 1928, foi sintetizada em laboratório, a ureia, primeira molécula orgânica e principal substrato da urease (Wöhler, 1828), além de ter sido identificada como a primeira enzima dependente de níquel (Dixon et al. 1975).

A urease está envolvida na remobilização do nitrogênio, bem como na assimilação de nitrogênio primário (Cao et al. 2010). Conhecidas por produzir amônia e carbamato após catalisar a hidrólise da ureia, o carbamato, em pH fisiológico, é hidrolisado espontaneamente para formar gás carbônico e uma segunda molécula de amônia (Moblely et al. 1995) (Figura 1). A planta pode aproveitar o nitrogênio presente na ureia para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, somente após esse ser catalisado pela urease (Follmer, 2008).

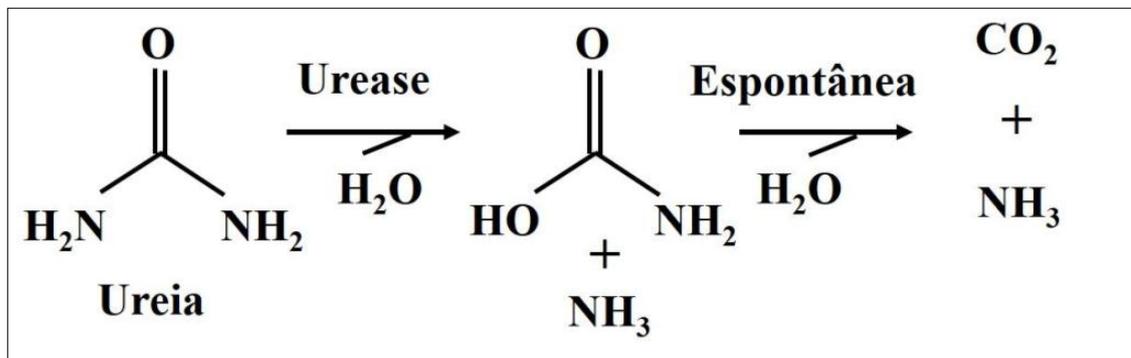


Figura 1: Reação de hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease. (Fonte: Adaptado a partir de Witte CP, 2011).

As ureases são sintetizadas por vários grupos de organismos, dentre eles bactérias, fungos e plantas. Apesar de serem ubiquamente presentes em todos os tecidos das plantas, essas enzimas não são encontradas nos animais (Moblely & Hausinger, 1989; Ligabue-Braun et al. 2013). Formadas por subunidades idênticas de aproximadamente 90-kDa, as ureases de plantas e fungos são proteínas homo-

oligoméricas, enquanto as ureases de bactérias são multímeros de duas ou três subunidades, designadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

As ureases apresentam alto grau de similaridade entre as sequências de aminoácidos, independente do organismo (maior que 50% entre bactérias e plantas e maior que 70% dentro de cada grupo) (Figura 2) (Mobley et al. 1995; Follmer, 2008, Krajewska, 2009, Ligabue-Braun et al. 2013).

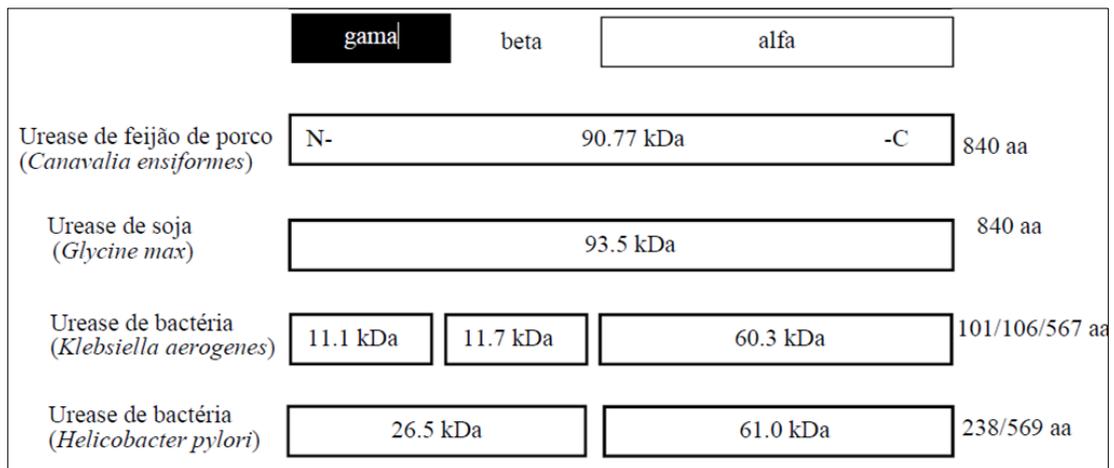


Figura 2: Comparação entre os domínios das ureases de diferentes organismos. Ureases de plantas (*Canavalia ensiformes* e *Glycine max*) são formadas por subunidades idênticas. Ureases bacterianas podem ter três subunidades (*Klebsiella aerogenes*) ou duas (*Helicobacter pylori*). (Fonte: Adaptado a partir de Krajewska, 2009).

A resolução da estrutura tridimensional da urease de *C. ensiformis* (JBU) (Balasubramanian & Ponnuraj, 2010), tornou possível a comparação estrutural das ureases de plantas com as estruturas já conhecidas das bactérias *Klebsiella aerogenes* (Jabri et al. 1995), *Bacillus pasteurii* (Benini et al. 1999) e *Helicobacter pylori* (Ha et al. 2001), confirmando o alto grau de similaridade entre as ureases de diferentes organismos.

### 1.2.1 UREASES EM PLANTAS

Os principais objetos de estudo de ureases vegetais foram as leguminosas soja (*G. max.*) e feijão de porco (*Canavalia ensiformis*). Enquanto as ureases de *C. ensiformis* foram mais bem caracterizadas bioquimicamente, as de *G. max* foram, geneticamente (Sirko e Brodzik, 2000).

As isoformas estruturais encontradas em feijão de porco são três: JBU, canatoxina e JBUREII. A JBU foi identificada como a urease majoritária (Sumner, 1926) tendo sua estrutura tridimensional resolvida 84 anos mais tarde (Balasubramanian e Ponnuraj, 2010), um avanço muito importante para o estudo de suas propriedades biológicas. A canatoxina, por sua vez, isolada e caracterizada em 1981 foi, 20 anos mais tarde, identificada como uma isoforma de urease (Carlini e Guimaraes 1981; Follmer et al. 2001). Posteriormente, uma terceira proteína desta família, JBUREII, foi encontrada em diferentes etapas de desenvolvimento das flores, dos embriões e dos brotos (Pires-Alves et al. 2003).

Em soja são descritas três isoformas, codificadas por três genes estruturais independentes: *Eu1*, *Eu4* e *Eu5*. Expresso em níveis baixos em todos os tecidos vegetais, a urease ubíqua, codificada pelo gene *Eu4* (Glyma11g248700), é responsável pela reciclagem da ureia derivada do metabolismo (Polacco et al. 1985; Torisky et al. 1994; Goldraij et al. 2003). Já a urease embrião-específica, altamente expressa em embriões em desenvolvimento e acumulada em sementes maduras, é codificada pelo gene *Eu1* (Glyma05g146000) (Polacco & Havir, 1979; Polacco & Winkler, 1984; Polacco & Holland, 1993). O gene *Eu5* (Glyma08g103000), mais recentemente identificado no genoma da soja, é um terceiro gene que codifica uma urease (SBU-III), que apresenta uma maior similaridade com a urease embrião-específica (Polacco et al. 2011; Polacco et al. 2013; Wiebke-Strohm et al. 2016).

### 1.2.2 PAPEL DE DEFESA DAS UREASES

Trabalhos realizados pela equipe coordenada pela Dra. Célia R. Carlini indicaram que ureases purificadas apresentam uma toxicidade *in vitro* contra insetos e fungos, mas que essa propriedade é independente da atividade catalítica (Follmer et al. 2004; Becker-Ritt et al. 2007). Além disso, também foi demonstrado que a região da proteína responsável pelo efeito entomotóxico não inibe o crescimento de fungos (Becker-Ritt et al. 2007). Estas evidências sugerem que domínios distintos das urease estejam envolvidos nas propriedades inseticida, fungicida e ureolítica (Carlini e Polacco, 2008).

A urease embrião-específica de soja e as ureases de feijão de porco purificadas foram letais quando injetadas ou adicionadas à dieta de insetos das

classes Hemiptera e Coleoptera, tais como *Rhodnius prolixus*, *Callosobruchus maculatus*, *Nezara viridula*, *Dysdercus peruvianus* e *Triatoma infestans* (revisado por Carlini e Polacco, 2008).

A atividade inseticida envolve um processo de ativação proteolítica da proteína relacionada com o perfil de enzimas digestivas dos insetos, que libera peptídeos tóxicos (Carlini et al. 1997; Ferreira da Silva et al. 2000). A partir da canatoxina foi isolado um peptídeo de ~10 kDa com grande toxicidade, denominado Pepcanatox (Carlini et al. 1997; Carlini et al. 2000). Posteriormente, foi identificada a região correspondente ao Pepcanatox no gene que codifica JBUREII e o peptídeo resultante denominado JABURETOX. A sequência que codifica JABURETOX foi clonada e expressa em *Escherichia coli*. O peptídeo recombinante mostrou atividade inseticida contra ninfas de *Dysdercus peruvianus*. Foi demonstrado, também, que o peptídeo apresenta toxicidade a insetos com digestão baseada em enzimas serínicas do tipo tripsina, como o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Mulinari et al. 2007). No entanto, mostrou-se inócuo se injetado intraperitonealmente ou administrados por via oral, em ratos neonatos e camundongos (Mulinari et al. 2004, 2007; Tomazetto et al. 2007).

A sequência gênica codificadora do JABURETOX foi eleita como candidata para a transformação genética de soja, visando a obtenção de plantas resistentes a insetos-praga. A transformação genética é uma ferramenta potencial para o aumento da qualidade das culturas e para a superação dos limites impostos pelo ambiente ao aumento da produção (Popelka et al. 2004). Portanto, o desenvolvimento de sistemas eficientes de transformação de plantas, fornecendo uma nova estratégia para seu melhoramento, pode contribuir para o desenvolvimento de cultivares agronomicamente superiores.

### 1.3 CONSTRUÇÃO DE VETORES

Utilizando a tecnologia Gateway, foram construídos quatro vetores contendo a sequência codificadora, completa e truncada do peptídeo tóxico JABURETOX, de *C. ensiformis*. Os vetores foram denominados pEarleyGate100-del (sequência truncada), pEarleyGate100-V5 (sequência completa), pH7WGD2-del (sequência truncada) e pH7WG2D-V5 (sequência completa). Os plasmídeos pH7WG2D (Karimi

et al. 2002) e pEarleyGate100 (Earley et al. 2006) foram selecionados em função de suas características. O pEarleyGate100 contém como marca de seleção o gene *bar*, que confere resistência ao herbicida glufosinato, que embora não seja recomendado para seleção de embriões somáticos de soja submetidos à transformação, apresenta a vantagem de facilitar a seleção de plantas transgênicas nas gerações segregantes. Já o pH7WG2D apresenta marca de seleção *hpt*, que confere resistência ao antibiótico higromicina-B, é amplamente utilizado para transformação de embriões somáticos de soja (Homrich et al. 2008, Wiebke-Strohm et al. 2012, Bencke-Malato et al. 2014), além de conter o gene repórter *gfp* que permite a seleção visual do tecido transformado (Figura 3).

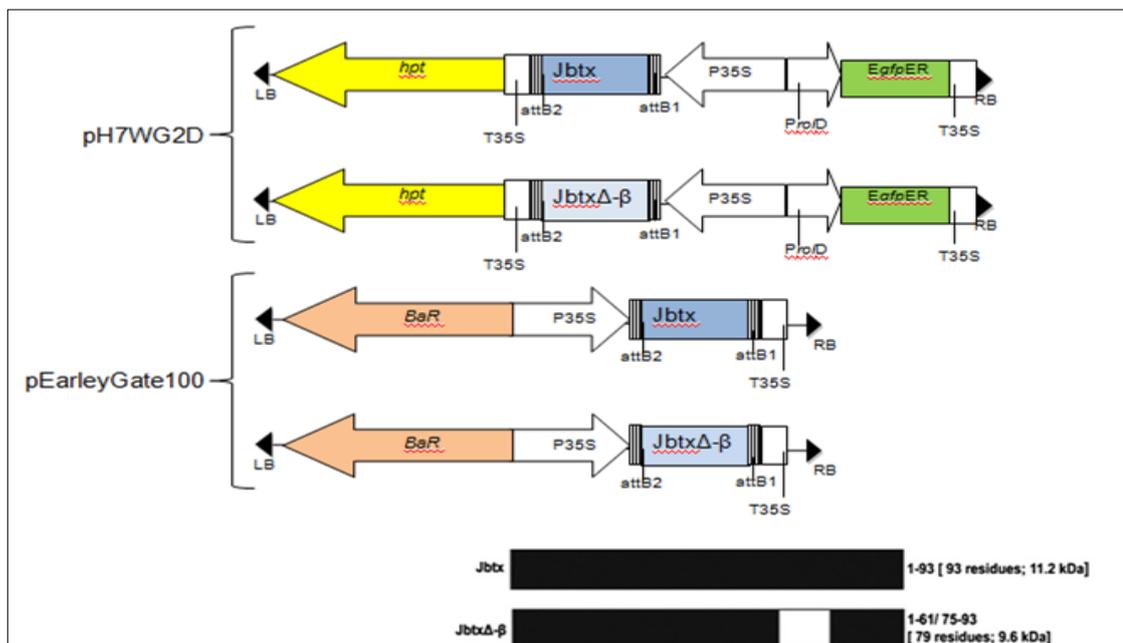


Figura 3: Construção de vetores: pEarleyGate100-del, pEarleyGate100-V5, pH7WGD2-del e pH7WG2D-V5.

## 1.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Concomitantemente à construção dos vetores, a fim de garantir o tecido alvo para os experimentos de transformação, culturas embriogênicas de soja das cultivares Bragg e IAS5 foram estabelecidas conforme descrito por Droste et al. (2002). Os conjuntos de embriões somáticos foram submetidos a dois experimentos de transformação via bombardeamento, seguindo protocolo descrito por Droste et al.

(2002). Os tecidos transformados foram selecionados em meio contendo os agentes 25 mg/L de higromicina-B ou 4 mg/L de glufosinato. Após quatro meses em meio seletivo, os tecidos verdes higromicina ou glufosinato-resistentes foram destacados e cultivados separadamente. Cada pedaço de tecido verde separado fisicamente de outros foi considerado um possível evento independente de transformação. Meios de cultura específicos (Droste et al. 2010) foram utilizados para indução da histodiferenciação, maturação e regeneração dos embriões recuperados. As plantas regeneradas a partir de um mesmo possível evento de transformação foram consideradas clones e então, foram aclimatadas em vermiculita e enviadas para a CCGL-Tec em Cruz Alta (Figura 4). Nesta empresa, elas foram transferidas para solo e mantidas em casa de vegetação até o completo desenvolvimento e produção de sementes. As sementes de cada planta foram coletadas separadamente e armazenadas em local apropriado. Um total de 242 plantas foram regeneradas.

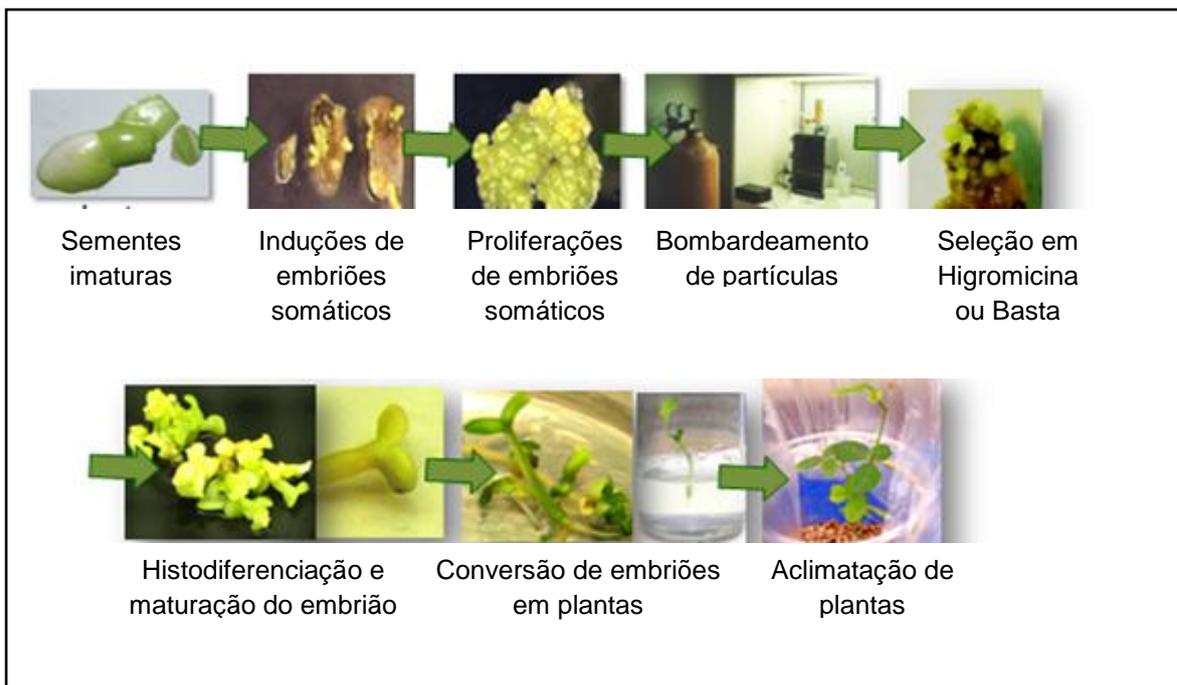


Figura 4: Transformação de embrião somático de soja por bombardeamento de partículas.

### 1.5 ANÁLISE MOLECULAR DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T<sub>0</sub> E T<sub>1</sub>

Para a análise molecular, foram coletadas folhas de cada planta. As extrações de DNA e RNA foram realizadas pelos métodos CTAB e Trizol, respectivamente e, posteriormente, utilizou-se o método PCR para a amplificação das sequências do transgene JABURETOX (JBTX) e dos genes marcadores de seleção *bar* ou *hpt*.

Para confirmação da presença do JBTX, foi utilizado o oligonucleotídeo senso da sequência promotora (35S) e o antisenso do transgene (Tabela 1).

	Alvo	Orientação	Sequência	Produto da PCR (pb)
PCR	<i>Actin 11</i>	Senso	CGGTGGTTCTATCTTGGCATC	142
		Antisenso	GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA	
	<i>Hpt</i>	Senso	GAGCCTGACCTATTGCATCTCC	512
		Antisenso	GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG	
	<i>Bar</i>	Senso	CCATCGTCAACCACTACATC	400
		Antisenso	AGAAACCCACGTCATGC	
	P35S	Senso	CGCACAATCCCCTATCCTT	400
	Jaburetox	Antisenso	CTATATAACTTTTCCACCTCCAAAAAC	
RT-qPCR	Jaburetox	Senso	GCAGAAGGGAATTTGGACATAAG	81
		Antisenso	TGGTGAAAGGACAATCAGGG	
	Metallo- protease	Senso	ATGAATGACGGTTCCCATGTA	114
		Antisenso	GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT	
	F-Box	Senso	AGATAGGGAATGTTGCAGGT	93
		Antisenso	CTAATGGCAATTGCAGCTCTC	

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores projetados para PCR e RT-qPCR.

Foram confirmadas 174 plantas transgênicas, oriundas de 76 eventos independentes de transformação (Tabela 2). O nível de expressão do transgene foi obtido por meio de análises moleculares dos níveis de mRNA em plantas de 20 eventos, por RT-qPCR. Cinco eventos apresentaram níveis desejados de transcritos. As sementes de cinco plantas transformadas (plantas-mãe), oriundas dos diferentes eventos, foram semeadas para a obtenção da geração T<sub>1</sub> e posteriormente, T<sub>2</sub>.

Método transformação	Construção	IAS5		Bragg	
		N	N	N	N
		eventos	plantas	eventos	plantas
Bombardeamento	pEarley100-v5	23	63	2	4
	pEarley100-del	33	82	4	5
	pH7WG2D-V5	5	8	-	-
	pH7WG2D-del	9	12	-	-

Tabela 2: Número de eventos e plantas transformadas confirmadas por PCR.

Uma observação interessante é de que a grande maioria dos eventos corresponde a construções baseadas no plasmídeo pEarleyGate100, cuja marca de seleção confere resistência ao glufosinato. Não existem relatos de transformação de soja utilizando este vetor, mas nossos dados apontam seu potencial para aumentar o número de eventos de transformação obtidos por experimento de transformação. Por outro lado, o pH7WG2D já foi utilizado para transformação de soja, originando número de eventos semelhante ao descrito neste trabalho (Homrich et al. 2008; Wiebke-Strohm et al. 2012; Bencke-Malato et al. 2014).

## 1.6 INSETOS

### 1.6.1 LAGARTA *HELICOVERPA ARMIGERA*

A *Helicoverpa armigera* é uma espécie de lagarta considerada uma praga polífaga. Como possui uma grande oferta de alimentos durante o ano inteiro uma vez que se alimenta de diferentes tipos de culturas como milho, soja e algodão, é muito difícil de ser controlada. Introduzida no Brasil recentemente, essa praga impressiona produtores rurais pelo seu alto poder de destruição já que se alimenta de diferentes estruturas vegetais, especialmente inflorescências e frutos. Com ovoposição noturna, a *H. armigera* coloca, em média, de 700 a 1700 ovos dispostos isoladamente nas plantas. Seu ciclo de vida varia de 30 a 38 dias (de acordo com a temperatura) - ovo até a fase adulta - e de 9 a 12 dias como mariposa. (CNPSO, EMBRAPA, [s.d.]) (Figura 5).

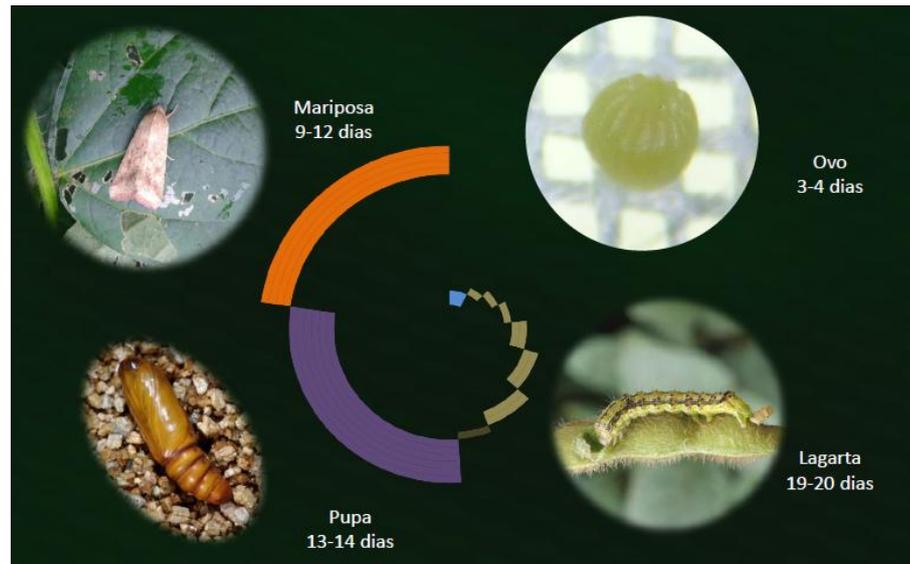


Figura 5: Ciclo de vida lagarta *Helicoverpa armigera*. (Fonte: CNPSO, EMBRAPA, [s.d.]).

### 1.6.2 LAGARTA *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

*Spodoptera frugiperda*, também conhecida popularmente como lagarta-do-cartucho ou ainda, como lagarta-militar, é um dos principais insetos-praga de diversas culturas agrícolas do Brasil. Assim como a lagarta *H. armigera*, descrita anteriormente, é considerada uma espécie polífaga que se alimenta de diferentes culturas como soja, algodão, milho, arroz, entre outras. A evolução da resistência a inseticidas e modificação no sistema de produção de cultivos, ocasionaram o agravamento dos problemas com esse inseto-praga. A intensificação da agricultura e os cultivos sucessivos possibilitam a sobrevivência de populações das lagartas, ocasionando graves infestações, em diferentes épocas de cultivo e fase de desenvolvimento da planta.

A postura da *Spodoptera frugiperda* é realizada nas folhas com aproximadamente 200 a 300 ovos, com período de incubação em torno de três dias. O período larval varia de 15 a 25 dias, com 4 a 7 instares de acordo com o biotipo, sexo, temperatura e planta hospedeira. O período pupal tem duração de aproximadamente dez dias quando ocorre a emergência de mariposas adultas. As mariposas possuem alta mobilidade e as fêmeas possuem elevado potencial reprodutivo, com capacidade de ovipositar mais de 1000 ovos. Tais ovos terão um ciclo de vida considerado curto variando de acordo com a temperatura (cerca de 25

a 30 dias - ovo até adulto - e 12 dias de longevidade quando em estado adulto. (POSTAL; MIRIM, 2012) (Figura 6).



Figura 6: Lagartas *Spodoptera frugiperda* em folha de soja. (Fonte: ELEVAGRO, [s.d.]).

Assim como para a *H. armigera*, o controle da lagarta *S. frugiperda* tem-se mostrado um grande desafio para os produtores rurais. A pulverização de inseticidas, com mesmo mecanismo de ação, já não se mostra tão eficaz no combate a estas pragas. Em consequência, nota-se um aumento expressivo de lagartas resistentes no campo.

As plantas Bt surgiram como uma interessante e eficiente estratégia no controle de *S. frugiperda* porém, o ciclo biológico relativamente curto, alto potencial reprodutivo e a polifagia, associados a um cenário de sobreposição ou sucessão de cultivos de plantas de semelhante interesse alimentar para as lagartas, ocasionou uma elevada pressão seletiva no que se refere aos inseticidas e proteínas de Bt empregados. Tais ações permitiram a propagação da praga devido ao cenário favorável para a evolução da resistência.

## 1.7 TESTE PILOTO

Tendo em vista a necessidade de novas estratégias no combate dessas pragas e em posse de plantas de soja com possível capacidade inseticida, foi realizado um teste piloto para avaliação da resistência das plantas transgênicas de

dois eventos a insetos da espécie *H. armigera*. Plantas transgênicas de soja da geração T<sub>1</sub> (pEarleyGate100-JbtxΔ-β e pEarleyGate100-Jbtx) e plantas não transgênicas (IAS5) foram desafiadas com larvas. Os insetos encontravam-se no primeiro instar (sendo inoculada uma larva por planta), as plantas estavam no estágio V2 de desenvolvimento e o experimento foi realizado em contenção. A mortalidade das lagartas foi avaliada 24h depois da inoculação. Como pode ser observada na Tabela 3, a taxa de mortalidade das lagartas foi superior quando alimentadas com plantas transgênicas, sendo que, para plantas pEarleyGate100-JbtxΔ-β, a diferença na mortalidade foi estatisticamente significativa.

Genótipo	N	Mortalidade (%)
pEarleyGate100-Jbtx-V5	13	46.15
pEarleyGate100-JbtxΔ-β	6	66.67*
IAS 5	29	17.24

Tabela 3: Efeito inseticida das plantas transgênicas T<sub>1</sub> sobre insetos do primeiro *instar* de *Helicoverpa armigera*. N: número de plantas utilizadas em cada evento. (\*) Dados apresentam diferença significativa entre folhas de plantas transgênicas e não transgênicas – Teste Exato de Fisher,  $p < 0.05$ .

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é a obtenção da prova de conceito do potencial inseticida do peptídeo JABURETOX, quando expresso em plantas transgênicas de soja.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterização molecular das plantas da geração T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> quanto à presença do transgene;
- b) Caracterização molecular das plantas transgênicas quanto ao nível de expressão do transgene;
- c) Realização de dois bioensaios nos quais plantas transgênicas foram desafiadas com lagartas *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda*.

### 3. JUSTIFICATIVA

Embora o Brasil seja o segundo maior produtor de soja em nível mundial, nosso país ainda é dependente de produtos transgênicos desenvolvidos no exterior. Além disto, as construções gênicas e os genes-alvo comumente utilizados nos experimentos de transformação de plantas são protegidos por propriedade intelectual, o que restringe seu uso no desenvolvimento de novos eventos para a liberação comercial. A utilização de novos genes com potencial para conferir características agrônômicas desejadas, identificados por grupos de pesquisa nacionais poderão facilitar a obtenção de produtos biotecnológicos inéditos e sobrepor a restrição de uso imposta por propriedade intelectual.

Insetos estão entre os principais limitadores bióticos da cultura da soja. Entre eles, destacam-se as lagartas *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda*. A análise preliminar dos dados obtidos no bioensaio piloto indicou que plantas que expressam o peptídeo JABURETOX são resistentes ao ataque de lagartas da espécie-praga *H. armigera*. Em vista disto, no presente estudo propusemos realizar novos bioensaios. No primeiro, folhas de plantas da progênie T<sub>2</sub> que expressavam JABURETOX foram desafiadas com lagartas de *H. armigera*. No segundo, folhas de plantas transformadas da geração T<sub>3</sub> foram oferecidas a lagartas de *S. frugiperda*. A expectativa foi confirmar os resultados obtidos no teste piloto. Os bioensaios com insetos alvo forneceriam a prova de conceito da capacidade inseticida do peptídeo e confirmariam seu potencial para geração de um futuro produto biotecnológico.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANÁLISES MOLECULARES DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T<sub>2</sub> E T<sub>3</sub>

Sementes da geração segregante T<sub>2</sub> e, posteriormente, T<sub>3</sub> foram semeadas, irrigadas periodicamente e mantidas em casa de vegetação (25 ± 3°C com fotoperíodo de 12 horas) até a coleta das folhas. Foi realizada a coleta de um folíolo da primeira folha trifoliolada completamente expandida para os testes de confirmação da presença do gene por PCR e expressão gênica por RT-qPCR. As extrações de DNA e RNA foram realizadas a partir dos tecidos congelados, pelos métodos CTAB e Trizol, respectivamente. Às amostras de DNA e RNA, foi adicionado *gel red*, resolvidas em gel de agarose 1,5% e sua qualidade foi verificada visualmente em luz ultravioleta. Todas as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop Lite.

Para certificação da qualidade necessária do DNA para realização das PCRs, inicialmente foi amplificado o gene endógeno actina 11 (Tabela 1). Posteriormente, reações de PCR foram feitas para amplificação das sequências do transgene (JBTX), e dos genes marcadores de seleção *bar* ou *hpt*, dependendo da construção originalmente utilizada na transformação.

### 4.2 BIOENSAIOS

#### 4.2.1 BIOENSAIO *HELICOVERPA ARMIGERA*

O teste piloto permitiu desenhar um experimento amplo, com um maior número amostral, buscando verificar a mortalidade das lagartas bem como identificar o instar mais sensível à toxicidade das plantas. O bioensaio foi realizado em parceria com pesquisadores da Universidade de Passo Fundo, onde folhas de plantas da progênie T<sub>2</sub> transformadas foram desafiadas com lagartas *H. armigera*.

As plantas controle utilizadas no experimento eram da cultivar IAS5, não transformadas, mas que passaram pela cultura de tecido. O delineamento experimental foi completamente casualizado com treze tratamentos e quatro repetições. A unidade experimental foi constituída por 10 placas de Petri nas quais

foi inoculada uma lagarta/placa. Até o quarto dia do ensaio, foram oferecidos para as lagartas, discos foliares de soja de 1 cm<sup>2</sup> a cada 48h. Após, foi ofertado um disco a cada 24h até o oitavo dia. Os discos foliares foram dispostos em placas de Petri sobre papel filtro umedecido com 200 µL de água destilada. As placas foram mantidas em câmara climatizada regulada a 25 ± 2°C, umidade relativa de 70 ± 10% com fotoperíodo de 12 horas. Após o oitavo dia as lagartas foram alimentadas com dieta artificial até a formação de pupas.

Diariamente, foi avaliado o número de lagartas mortas e observada a troca de instares, através do resgate da cápsula cefálica e/ou da exúvia das lagartas. O consumo de área foliar foi avaliado a cada 48h (renovação do disco foliar), comparando-se o valor inicial com a área restante, medida em papel milimetrado. Após o oitavo dia, quando as lagartas passaram a ser alimentadas com dieta artificial, avaliou-se a mortalidade a cada 48h até o 28° dia.

#### **4.2.2 BIOENSAIO LAGARTA *SPODOPTERA FRUGIPERDA***

A partir dos resultados promissores obtidos com o bioensaio com lagartas *H. armigera*, optou-se pela realização de outro experimento no qual folhas das plantas confirmadamente transgênicas foram desafiadas com a lagarta *S. frugiperda*. Sementes da geração segregante T<sub>3</sub>, oriundas de 3 eventos transgênicos e de plantas não transformadas (controles), foram semeadas em potes plásticos contendo terra (Figura 7). Assim como realizado no bioensaio com lagartas *H. armigera*, as plantas foram irrigadas periodicamente e mantidas na sala de crescimento (25 ± 3 °C com fotoperíodo de 12 horas) até o estágio V2 de desenvolvimento. Após foi efetuada a coleta de um folíolo do primeiro trifólio, completamente expandido, para a análise molecular a fim de verificar a presença do transgene por PCR e quantificação do nível de transcritos por RT-qPCR, conforme descrito no item 4.1.



Figura 7: Plantas da geração T<sub>3</sub> na sala de crescimento de soja (laboratório de Genética Vegetal da UFRGS).

Em parceria com o laboratório de Biologia, Ecologia e Controle Biológico de Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, optou-se pela realização do experimento em suas dependências devido à ampla experiência com o manejo da lagarta *S. frugiperda* bem como ao espaço físico disponível.

Após a confirmação do estado transgênico e seleção das plantas candidatas conforme descrito acima, o bioensaio foi delineado. Neste ensaio, as unidades amostrais foram folhas inteiras das plantas T<sub>3</sub> selecionadas com, aproximadamente, 5 cm de comprimento. Cada folha foi disposta em uma placa de Petri contendo um fundo de papel filtro e uma lagarta foi inoculada por placa (Figura 8). O bioensaio foi realizado em uma sala climatizada à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  com fotoperíodo de 12 horas. Até o quarto dia do ensaio, as folhas de soja ofertadas foram trocadas a cada 48h. Após foram trocadas a cada 24h até o oitavo dia. A cada troca de folha, cada fundo de papel filtro foi umedecido com 350  $\mu\text{L}$  de água destilada. Após o oitavo dia as lagartas foram alimentadas com dieta artificial até a formação de pupas. Diariamente, até o oitavo dia, foi avaliado o número de lagartas mortas e, após o oitavo dia, quando as lagartas passaram a ser alimentadas com dieta artificial, avaliou-se a mortalidade a cada 48h até a transformação da pupa em mariposa.

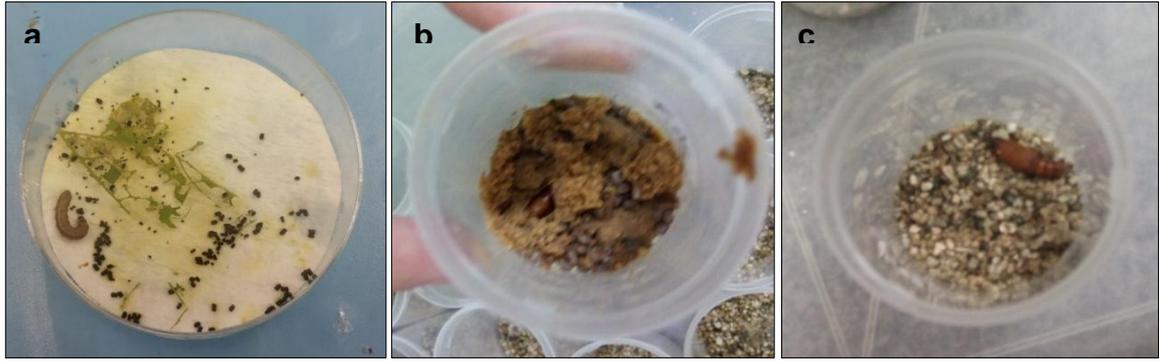


Figura 8: Etapas do ciclo de vida da *Spodoptera frugiperda*: **a)** lagarta alimentada com folhas contendo JABURETOX; **b)** lagarta empupada logo após período de alimentação a base de dieta; **c)** pupa transferida para vermiculita, período que antecede sua emergência.

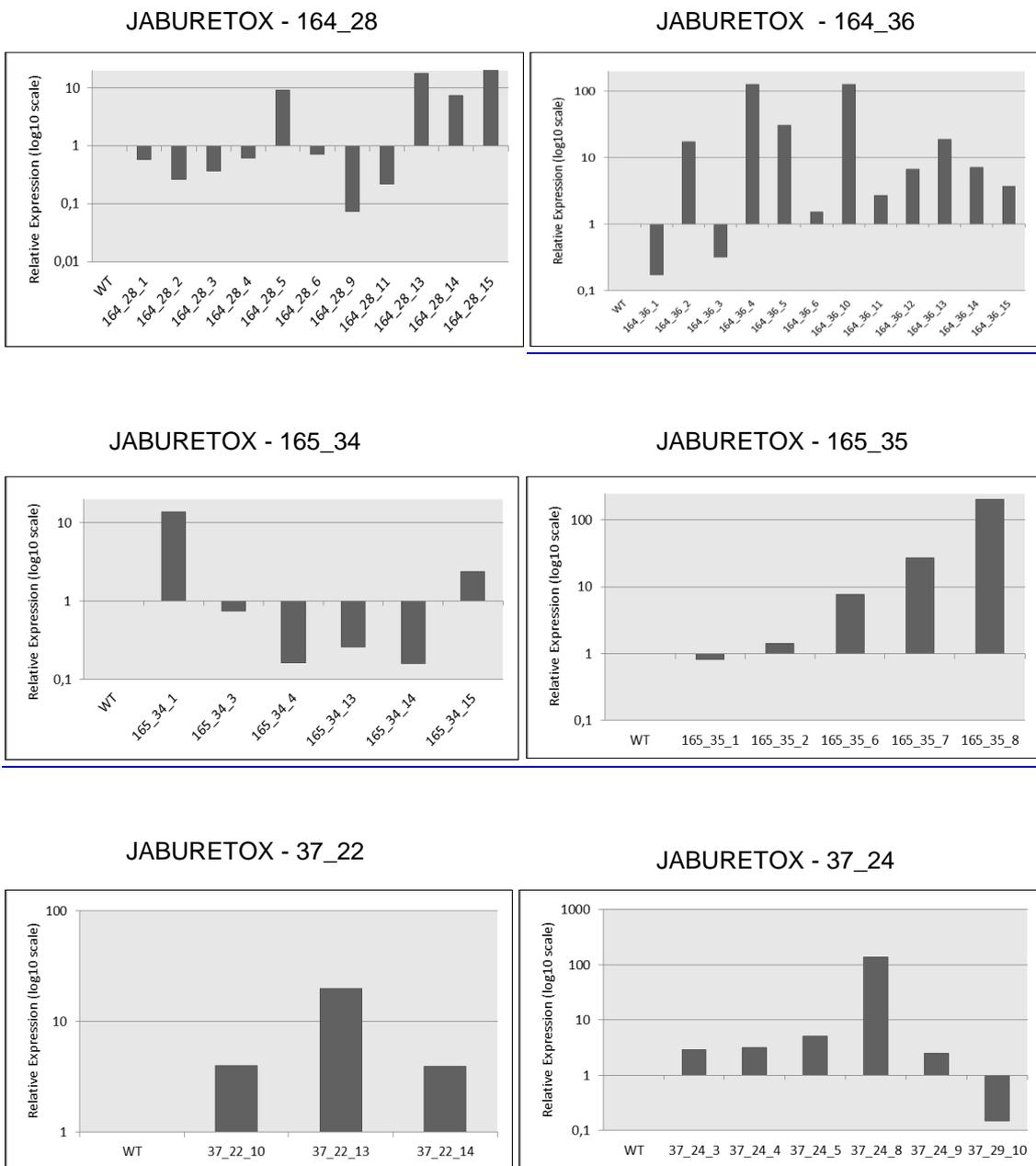
#### 4.2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Com a assessoria do professor Dr. João Riboldi, do Instituto de Matemática e Estatística da UFRGS, foram realizadas as análises estatísticas referentes aos dois bioensaios executados. Todos os dados anteriormente citados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de via única. O Teste de Tukey foi utilizado para identificar se as médias diferem significativamente do controle ou, entre si, quando analisadas duas a duas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES MOLECULARES DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T<sub>2</sub>

A presença de fragmentos dos tamanhos esperados confirmou a condição transgênica das linhagens testadas. No total, 50 plantas da geração T<sub>2</sub> foram avaliadas, das quais trinta estavam superexpressando JABURETOX (Jbtx) (Figura 9).



JABURETOX - 35\_11

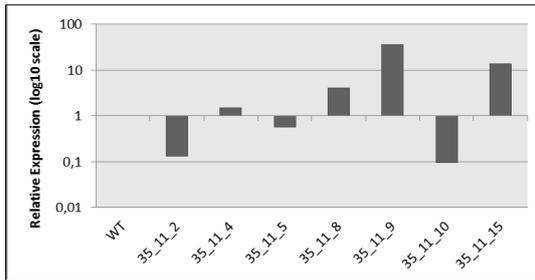


Figura 9: Níveis de expressão relativa (RT-qPCR) da sequência codificadora do peptídeo JBTX em folhas de plantas transgênicas da geração  $T_2$  de soja. Os valores obtidos para as plantas transformadas correspondem à média obtida a partir de uma planta com quatro replicatas técnicas. Os valores obtidos para as plantas não transformadas (WT) correspondem à média obtida a partir de duas plantas com quatro replicatas técnicas cada. Os genes referência F-Box e Metalloprotease foram utilizados como controles internos para normalizar a quantidade de mRNA presentes em cada amostra. Os níveis de transcritos das plantas não transformadas (WT) foram utilizados para normalizar o acúmulo de transcritos nas plantas transformadas.

As plantas com maior expressão gênica foram selecionadas para o bioensaio. As lagartas provieram da criação em laboratório, em dieta artificial. Foram utilizados quatro eventos e três plantas de cada evento mais uma amostra controle para a realização dos bioensaios (Tabela 4).

Evento	Nº Planta
164_36	5
	4
	10
164_28	5
	13
	15
165_35	6
	7
	14
37_22	10
	13
	14
Controle	

Tabela 4: Eventos e plantas utilizadas no bioensaio com a *Helicoverpa armigera* (geração  $T_2$ ).

## 5.2 RESULTADOS BIOENSAIO LAGARTA *HELICOVERPA ARMIGERA*

A taxa de mortalidade de lagartas alimentadas com folhas das plantas transgênicas foi superior à verificada nas alimentadas com plantas controle. (Figuras 10 a e b).

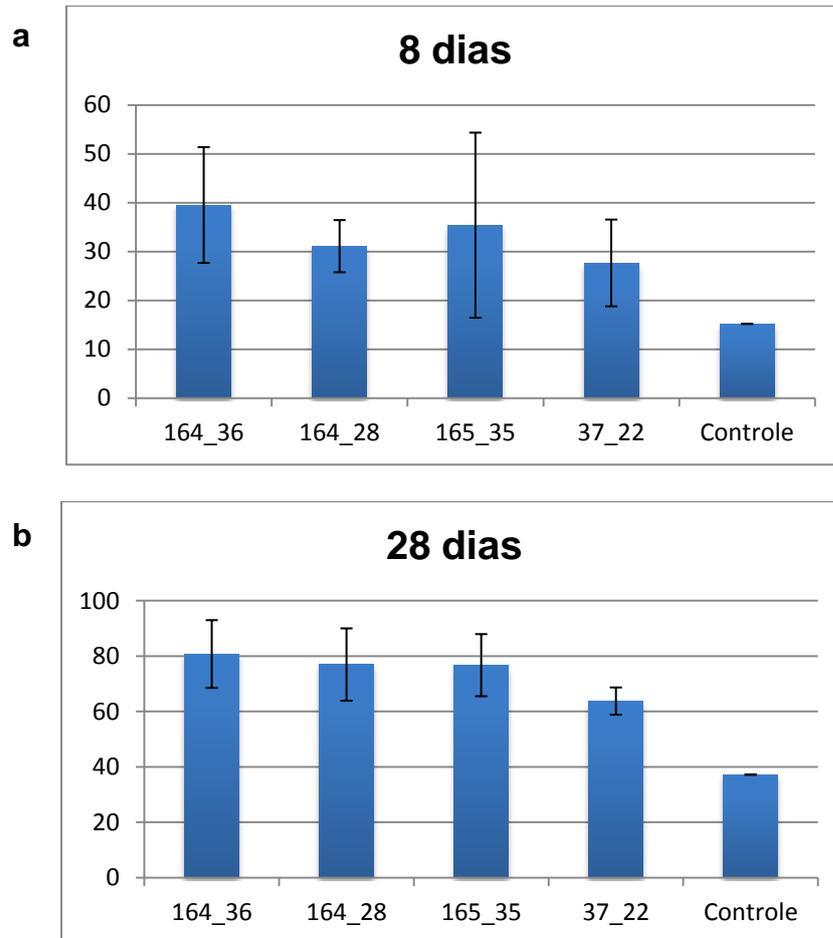


Figura 10: a) Mortalidade acumulada das lagartas de *H. armigera* alimentadas com discos foliares de plantas de diferentes eventos, por oito dias. (b) Mortalidade acumulada das lagartas de *H. armigera* alimentadas com dieta artificial até o 28º dia.

A análise de variância indicou que as diferenças entre genótipos são significativas ( $F=4,22$ ;  $p=0,0062$ ). A comparação de médias pelo teste de Tukey indicou que as lagartas alimentadas com folhas de plantas transgênicas apresentaram mortalidade significativamente maior do que as alimentadas com plantas controle. Não houve diferença significativa entre os eventos transgênicos (Figura 11).

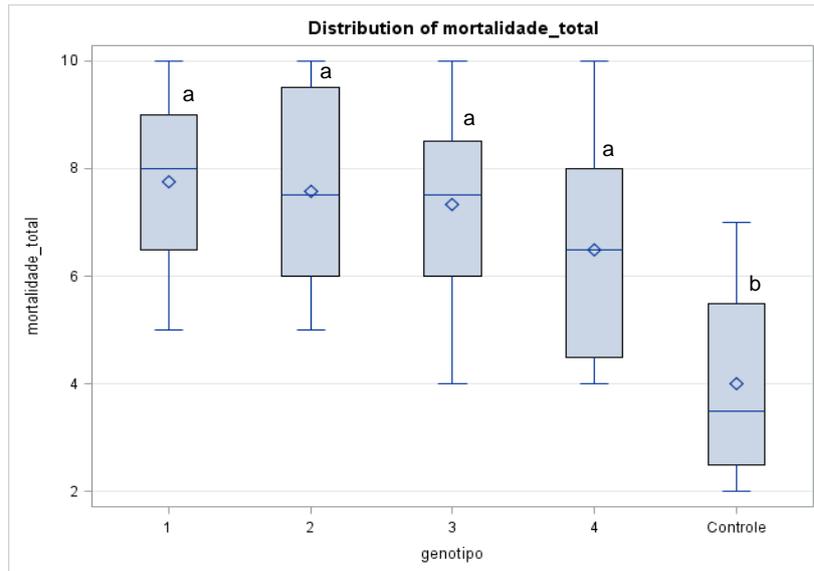


Figura 11: Distribuição da mortalidade média acumulada das lagartas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares por oito dias, seguidos com dieta artificial até o 28º dia. Médias com a mesma letra não diferem entre si (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Após oito dias de alimentação com discos foliares contendo o peptídeo JABURETOX, também foi analisada a troca de instares das lagartas. Embora não tenha sido detectada diferença estatisticamente significativa, se observou um pequeno atraso na troca de instares entre as lagartas sobreviventes, alimentadas com folhas de plantas transgênicas, quando comparadas com as alimentadas com folhas de plantas controle (Figura 12).

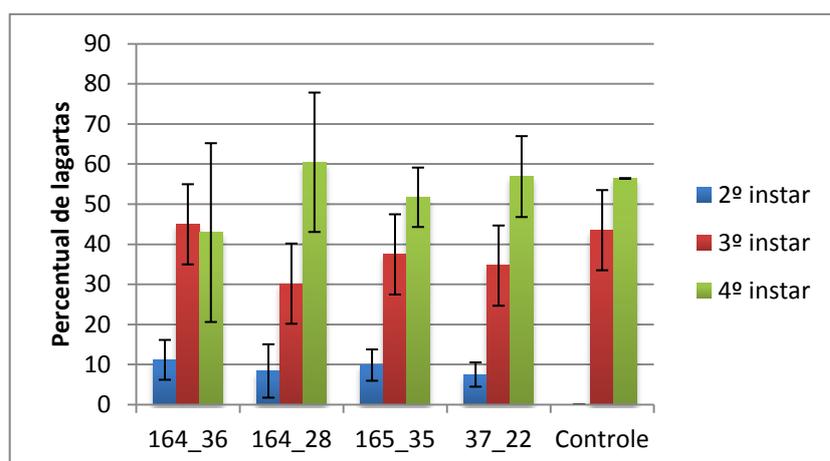


Figura 12: Percentual de lagartas que atingiram o 2º, 3º e 4º instar após serem alimentadas por oito dias com discos foliares de diferentes eventos de plantas de soja geneticamente modificada contendo o gene JABURETOX, seguidos de 20 dias em dieta artificial.

Foi observado que não houve diferença na área foliar consumida por lagartas alimentadas com discos de plantas transgênicas quando comparada com a consumida por lagartas alimentadas com discos de plantas controle até o oitavo dia (Figura 13).

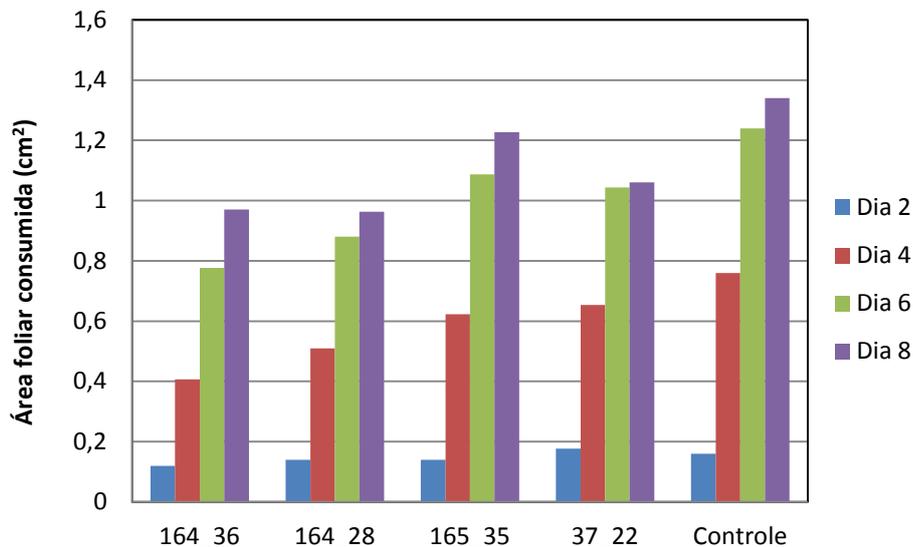


Figura 13: Consumo acumulado até o oitavo dia de lagartas *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares de diferentes eventos e plantas de soja geneticamente modificada contendo o gene JABURETOX.

Os dados obtidos confirmaram os resultados do projeto piloto evidenciando que plantas transgênicas que expressam JABURETOX apresentaram resistência a lagartas de *H. armigera*.

### 5.3 ANÁLISES MOLECULARES DAS PLANTAS DA GERAÇÃO T<sub>3</sub>

A partir da análise de 32 plantas, 23 apresentaram superexpressão de transcritos da sequência codificadora do peptídeo JBTX. Destas, foram selecionadas 14 plantas, oriundas de três eventos independentes de transformação e duas plantas da cultivar IAS5, não transformadas, mas que passaram para a cultura de tecido, para a realização do experimento (Tabela 5).

Evento	N° Planta
164_28	15
	16
	18
	19
	24
165_35	25
	26
	29
	30
	31
37_22	1
	5
	6
	7
Controle	

Tabela 5: Eventos e plantas utilizadas no bioensaio com a *Spodoptera frugiperda* (geração T<sub>3</sub>).

#### 5.4 RESULTADOS BIOENSAIO LAGARTA *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Diferente do verificado no experimento anterior, nos primeiros oito dias do bioensaio com *Spodoptera frugiperda*, não houve mortalidade de lagartas (nem mesmo das alimentadas com folhas de plantas controle). A análise de variância dos dados obtidos após 28 dias indicou diferença estatística entre os genótipos ( $F=4,57; p=0,0234$ ). Embora tenha sido detectada diferença entre os eventos transgênicos, a mortalidade das lagartas alimentadas com folhas de plantas transformadas não diferiu da mortalidade daquelas alimentadas com folhas de plantas controle (Figuras 14 e 15).

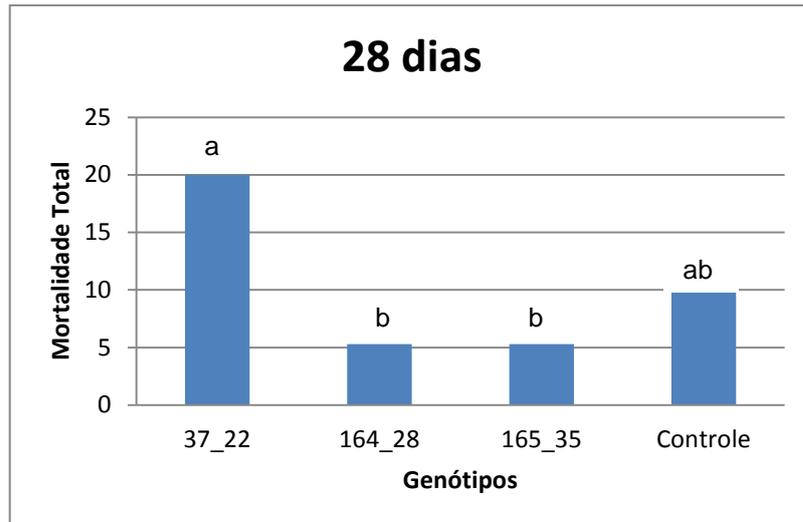


Figura 14: Mortalidade acumulada das lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de plantas transgênicas e controles até o oitavo dia, seguidos por dieta artificial até o 28º dia.

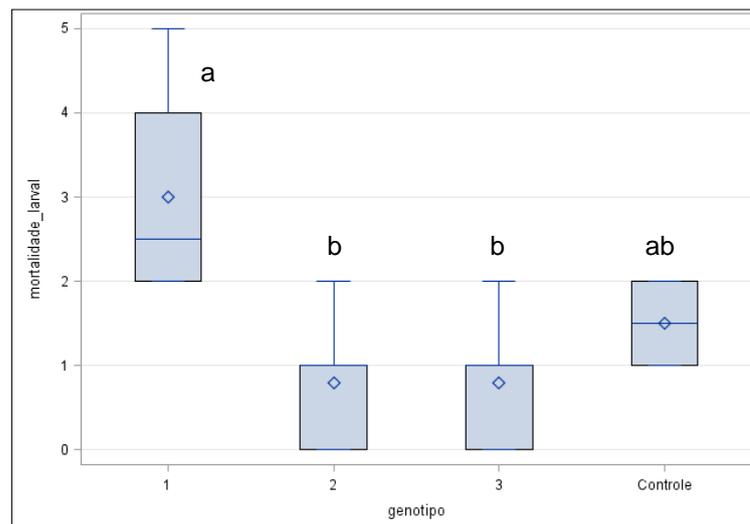


Figura 15: Distribuição da mortalidade média acumulada das lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de plantas transgênicas e controles por oito dias, seguidos com dieta artificial até o 28º dia.

Médias com a mesma letra não diferem entre si (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Foi analisado também o desenvolvimento das lagartas após os primeiros 28 dias. Conforme pode ser verificado na Tabela 6, uma porcentagem superior a 76% das lagartas alimentadas com folhas de plantas transgênicas e controles que atingiu a fase de pupa, emergiu. Esse resultado indica que o JABURETOX não tem efeito marcante no desenvolvimento das lagartas de *S. frugiperda*.

<b>Pupas de lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i></b>				
Eventos	Pupas	Emergência	Pupas inviáveis	% Viabilidade de pupas
<b>37_22_1</b>	10	9	1	90,0
<b>37_22_5</b>	13	13	0	100
<b>37_22_6</b>	13	11	2	84,6
<b>37_22_7</b>	12	11	1	91,7
<b>164_28_15</b>	13	10	3	76,9
<b>164_28_16</b>	15	13	2	86,7
<b>164_28_18</b>	14	12	2	85,7
<b>164_28_19</b>	15	13	2	86,7
<b>164_28_24</b>	14	14	0	100
<b>165_35_25</b>	13	12	1	92,3
<b>165_35_26</b>	15	14	1	93,3
<b>165_35_29</b>	14	14	0	100
<b>165_25_30</b>	15	14	1	93,3
<b>165_25_31</b>	14	11	3	78,6
<b>Controles</b>				
<b>43</b>	13	12	1	92,3
<b>44</b>	14	14	0	100

Tabela 6: Eventos, pupas e viabilidade de pupas formadas por lagartas *Spodoptera frugiperda*.

Embora tenha sido demonstrado, em testes *in vitro*, que JABURETOX apresenta toxicidade a insetos com digestão baseada em enzimas serínicas do tipo tripsina, como o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Mulinari et al. 2007), nossos resultados da expressão do peptídeo em plantas transgênicas não confirmaram tal toxicidade.

Em bioensaios realizados com plantas transgênicas de milho foi obtido resultado semelhante ao nosso, ou seja, a mortalidade de lagartas alimentadas com folhas de plantas de diferentes eventos expressando JABURETOX foi baixa e não diferiu das alimentadas com folhas de plantas não transformadas (Didoné, 2018). Entretanto, a autora observou um retardo no desenvolvimento larval e uma mortalidade de pupas resultantes das lagartas alimentadas com plantas transgênicas maior (25 a 31%) do que a registrada em nosso trabalho.

Em relação ao efeito do JABURETOX no em lagartas de *S. frugiperda*, nossos resultados não são conclusivos. Serão necessários novos bioensaios para acompanhar o desenvolvimento das lagartas até o estágio adulto, sua fertilidade e viabilidade de seus descendentes.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de soja possui grande destaque no setor do agronegócio mundial. Hoje, o Brasil é como o segundo maior produtor dessa leguminosa e possui uma alta relevância na nossa economia. Devido a amplas aplicações, há um grande interesse econômico em tornar o cultivo dessa espécie cada vez mais produtivo. Sendo assim, estratégias que tornem as safras mais rentáveis e as plantas menos suscetíveis a estresses bióticos e abióticos são de extrema importância.

Dados obtidos neste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de um futuro produto biotecnológico com o objetivo de contornar a ação de lagartas de *H. armigera* consideradas altamente prejudiciais à cultura da soja. A busca por maiores informações referentes ao mecanismo de ação do JABURETOX no metabolismo das lagartas de *S. frugiperda* é uma das próximas etapas da nossa investigação. Testes que incluam insetos não-alvo também se fazem necessários para que se obtenha uma maior segurança para eventual futura aprovação de um produto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Balasubramanian A, Ponnuraj K (2010) Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *J Mol Bio* 400:274-283.
- Becker-Ritt AB, Martinelli AH, Mitidieri S, Feder V, Wassermann GE, Santi L, Vainstein MH, Oliveira JT, Fiuza LM, Pasquali G, Carlini CR (2007) Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* 50: 971-983.
- Bencke-Malato M, Cabreira C, Wiebke-Strohm B, Bücken-Neto L, Mancini E, Osorio MB, Homrich MS, Turchetto-Zolet A, De Carvalho M, Stolf R, Weber R, Westergaard G, Castagnaro A, Abdelnoor R, Marcelino-Guimarães F, Margis-Pinheiro M, Bodanese-Zanettini M (2014) *BMC Plant Biology* 2014, 14: 236.
- Cao F-Q, Werner AK, Dahncke K, Romeis T, Liu L-H, Witte CP (2010) Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiol* 15:98-108.
- Carlini CR, Guimaraes JA (1981) Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19: 667-675.
- Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA (1997) Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin like enzymes. *J Econ Entomol* 90: 340-348.
- Carlini CR, Polacco JC (2008) Toxic Properties of Urease. *Crop Sci* 48: 1665-1672.
- CONAB (2010) Companhia Nacional do Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Séries Históricas. Disponível em <[www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2)>
- CNPSo, EMBRAPA: Módulo1 - Ameaças Fitossanitárias Paisagem do Agrossistema, [s.d.], v.1, p 27-30 Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/caravana/pdfs/modulo1.pdf>> Acesso em: 03 maio 2019.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Monitoramento agrícola- Safra 2018/19, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1 88, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 28 abr.2019.
- DIDONÉ, D.A. Desenvolvimento de plantas de milho que expressam JABURETOX visando resistência a lepidópteros-praga. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo. 100 pg. 2018.
- Dita MA, Rispaill N, Prats E, Rubiales D, Singh KB (2006) Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147: 1-24.

Dixon NE, Gazzola TC, Blakeley RL, Zerner B (1975) Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? J Am Chem Soc 97: 4131-4133.

Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. Euphytica 127 367-376.

Droste A, Silva AM, Souza IF, Wiebke-Strohm B, Bucker-Neto L, Bencke M, Sauner MV, Bodanese-Zanettini MH (2010) Screening of Brazilian soybean genotypes with high potential for somatic embryogenesis and plant regeneration. Pesq Agrop Bras 45: 715-720.

Earley WE, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. Plant J 45: 616-629.

ELEVAGRO, [s.d.]. Disponível em: <<https://elevagro.com/foto/lagartas-de-spodoptera-frugiperda-em-folha-de-soja/>> Acesso 10 maio 2019.

Follmer C (2008) Insights into the role and structure of plant ureases. Phytochemistry 69:18-28.

Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja-Fidalgo C, Guimaraes JA, Carlini CR (2001) Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. Biochem J 360: 217-224.

Follmer C, Real-Guerra R, Wasserman GE, Olivera-Severo D, Carlini CR (2004) Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. Eur J Biochem 271: 1357-1363.

Goellner K, Loehrer M, Langenbach C, Conrath U, Koch E, Schaffrath U (2010) *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. Mol Plant Pathol 11: 169-177.

Goldraij A, Beamer LJ, Polacco JC (2003) Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. Plant Physiol 132: 1801-1810.

Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. Nat Struct Biol 8: 505-509.

Homrich, M.S., L.M.P. Passaglia, J.F. Pereira, P.F. Bertagnolli, G. Pasquali, M.A. Zaidi, I. Altosaar, and M.H. Bodanese-Zanettini. 2008. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill, Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. Gen Mol Biol 31:522-531.

- Jabri E, Carr MB, Hausinger RP, Karplus PA (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* 268: 998-1004.
- Karimi, M., D. Inze, and A. Depicker. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193-195.
- Krajewska B (2009) Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. *J Mol Catal B: Enzymatic* 59: 9-21.
- Ligabue-Braun R, Andreis FC, Verli H, Carlini CR (2013) 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases. *Naturwissenschaften* 100:459-467.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods* 25:402-408.
- Menegassi A, Wassermann GE, Olivera-Severo D, Becker-Ritt AB, Martinelli AH, Feder V, Carlini CR (2008) Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. *J Agric Food Chem* 56: 4399-4405.
- Mobley HLT, Hausinger RP (1989) Microbial ureases-significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews* 53:85-108.
- Mobley HL, Island MD, Hausinger RP (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59: 451-480.
- Mulinari F, Pires-Alves M, Moraes MG, Kurtenbach E, Carlini CR, Grossi-de-Sá MF (2004) Toxina praguicida, construção gênica e método de controle de pragas. Propriedade intelectual. Brasil.
- Mulinari F, Staniscuaski F, Bertholdo-Vargas LR, Postal M, Oliveira-Neto OB, Rigden DJ, Grossi-de-Sa MF, Carlini CR (2007) JABURETOX-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28: 2042-2050.
- Piovesan AR, Staniscuaski F, Marco-Salvadori J, Real-Guerra R, Defferrari MS, Carlini CR (2008) Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect. Biochem Mol Biol* 38:1023-1032.
- Pires-Alves M, Grossi-de-Sa MF, Barcellos GB, Carlini CR, Moraes MG (2003) Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol* 44: 139-145.
- Polacco JC, Havir EA (1979) Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *J Biol Chem* 254: 1707-1715.

- Polacco JC, Hyten DL, Medeiros-Silva Ma, Sleper DA, Bilyeu KD (2011) Mutational analysis of the major soybean UreF paralogue involved in urease activation. *J Exp Bot* 62:1-10.
- Polacco JC, Mazzafera P, Tezotto T (2013) Opinion - Nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Science* 199-200:79-90.
- Polacco, J.C., and R.G. Winkler. 1984. Soybean leaf urease: a seed enzyme? *Plant Physiol* 74:800-803.
- Polacco JC, Holland MA (1993) Roles of urease in plant cells. *Int Rev Cytol*: 65-103.
- Polacco JC, Krueger RW, Winkler RG (1985) Structure and possible ureide degrading function of the ubiquitous urease of soybean. *Plant Physiol Heidelberg: Springer* 79:794- 800.
- Popelka JC, Terryn N, Higgins TJV (2004) Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Sci* 167: 195–206.
- Postal, Caixa; MIRIM, Mogi. Manejo da resistência de frugiperda a inseticidas e plantas Bt. [s. l.], n. 22, 2012.
- Reetz ER, Sntos C, Corrêa S, Silveira Dd, Carvalho Cd, Beling RR (2008) Anuário Brasileiro da Soja In: Beling RR (ed) Anuário Brasileiro da Soja 2008, p 136.
- Rechenmacher, C.O papel das ureases de soja (*Glycine max*) (L.) Merr.) no desenvolvimento da planta e na proteção contra nematoide causador de galha. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 56 pg. 2016.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, et al. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- Sirko A, Brodzik R (2000) Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol* 47: 1189-1195.
- Staniscuaski F, Ferreira-DaSilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR (2005) Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45:753-760.
- Staniscuaski F, Brugge TEV, Carlini CR, Orchard I (2009) *In vitro* effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide JABURETOX-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J Insect Physiol* 55:255-263.
- Staniscuaski F, Carlini CR (2012) Plant Ureases and Related Peptides: Understanding Their Entomotoxic Properties. *Toxins* 4:55-67.

Sumner JB (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. J Biol Chem 69: 435-444. Tomazetto G, Mulinari F, Staniscuaski F, Settembrini BP, Carlini CR, Ayub MAZ (2007) Expression kinetics and plasmid stability of recombinant E coli encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. Enzyme and Microbial Technology 41:821-827.

Torisky RS, Griffin JD, Yenofsky RL, Polacco JC (1994) A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. Mol Gen Genet 242: 404-414.

Weber, R. Ferramentas biotecnológicas com potencial aplicação na obtenção de plantas transgênicas de soja com maior resistência a estresses abióticos e bióticos. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 140 pg. 2011.

Wiebke-Strohm B. Obtenção de plantas estavelmente transformadas pelo sistema integrado bombardeamento/*Agrobacterium* e análise funcional dos genes que codificam as ureases estruturais da soja; Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 131 pg. 2010.

Wiebke-Strohm B, Pasquali G, Margis-Pinheiro M, Bencke M, Bucker-Neto L, Becker-Ritt AB, Martinelli AHS, Rechenmacher C, Polacco JC, Stolf R, Marcelino FC, Abdelnoor RV, Homrich MS, Del Ponte EM, Carlin CR, De Carvalho MCCG, Bodanese-Zanettini MH (2012) Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi .Plant MolBiol 78:1-13.

Wiebke-Strohm B, Ligabue-Braun R, Rechenmacher C, De Oliveira-Busatto LA Carlini CR, Bodanese-Zanettini MH (2016) Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family. Plant Physiology and Biochemistry (Paris) 101:96-104.

Wöhler F (1828) Über künstliche bildung des harnstoffs. Ann Phys Chem 253-256.