

Efeito do Tegumento de *Phaseolus vulgaris*  
(Fabaceae) Sobre o Desenvolvimento  
Embrionário e Larval de *Callosobruchus*  
*maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae)

**LEONARDO FIGUEIRA REIS DE SÁ**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
ABRIL- 2013

Efeito do Tegumento de *Phaseolus vulgaris*  
(Fabaceae) Sobre o Desenvolvimento  
Embrionário e Larval de *Callosobruchus*  
*maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae)

**LEONARDO FIGUEIRA REIS DE SÁ**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia (Biologia celular).

**Orientadora: Antonia Elenir Amâncio Oliveira**

**Co-orientador: Gustavo Lazzaro Rezende**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
ABRIL- 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

503 / 2013

Sá, Leonardo Figueira Reis de

Efeito do tegumento de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) sobre o desenvolvimento embrionário e larval de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) / Leonardo Figueira Reis de Sá. -- Campos dos Goytacazes, 2013. x, 57, [3] f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos.

Área de concentração: Biologia celular

Orientador: Oliveira, Antonia Elenir Amancio

Bibliografia: f. 46-57

1. Tegumento de sementes 2. *Callosobruchus maculatus* 3. Embriogênese de insetos 4. Digestão de insetos 5. Sementes artificiais I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

571.6  
S111e

Efeito do Tegumento de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) Sobre o Desenvolvimento Embrionário e Larval de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae)

**LEONARDO FIGUEIRA REIS DE SÁ**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia (Biologia celular).

Aprovada em: / /

Comissão examinadora:

---

Dr. José Roberto da Silva LIBHM-NUPEM-UFRJ

---

Dr. Richard Ian Samuels LEF-CCTA-UENF

---

Dr<sup>a</sup>. Marilvia Dansa de Alencar Petretski LQFPP-CBB-UENF

---

Dr. Gustavo Lazzaro Rezende  
Co-orientador

---

Dr. Antonia Elenir Amâncio Oliveira  
Orientadora

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
ABRIL - 2013

*Dedico essa conquista aos meus amados pais Paulo e Rita e meu irmão Leandro, pois sem eles nada disso seria possível!*

*“Pedras no caminho? Guardo todas,  
um dia vou construir um castelo...”*

*Fernando Pessoa*

*“Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”*

*William Shakespeare*

## *Agradecimentos*

A caminhada foi longa e árdua, em muitos momentos me senti perdido e com medo de todos os obstáculos que foram surgindo durante esses dois anos, mas sempre nos momentos em que mais precisei, tive pessoas que sempre me levantavam e me faziam sentir confiante e acreditar que tudo ia dar certo. Sendo assim, não poderia deixar de registrar a minha gratidão para com vocês.

Agradeço a Deus pela sua força e presença em todos os momentos, principalmente naqueles em que os problemas pareciam sem solução.

Aos meus pais Rita e Paulo por todo esforço destinado a minha formação moral e profissional. Obrigado por acreditarem em meu potencial e sempre me darem força para persistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão Leandro, por ser-me exemplo de vida e força de vontade para continuar nesta longa caminhada.

A Nathalia Abreu pelos momentos felizes e sempre ter tido uma palavra de calma nos meus momentos de turbulência.

A minha orientadora Antonia Elenir Amâncio Oliveira por ter acreditado em meu potencial e me orientado nessa dissertação. Agradeço também por ser minha segunda mãe, pelos puxões de orelha e por sempre ter os conselhos mais sábios.

Ao meu co-orientador Gustavo Lazzaro por toda ajuda e sugestões em meus experimentos. Agradeço pela amizade e por todos os momentos de descontração.

A Elane Ribeiro por ter me ajudado, sempre com muita atenção e bom humor, nas eventuais dúvidas que surgiram durante os experimentos.

A Arianne Fabres, minha vizinha de bancada, por sempre ter uma boa sugestão nos momentos de dúvida. Agradeço também pelos cafés nas horas de sono.

A Lorena Rangel pela amizade e por sempre mandar seus quitutes deliciosos para o laboratório.

A dona Maria Elena pelas aulas de redação e as histórias engraçadas de seu tempo. Sei que a senhora está torcendo por mim daí de cima!

A dona Lucy Ramos, pelas aulas particulares que me deram base para conseguir vencer.

E a todos vocês que participaram direta e/ou indiretamente desse trabalho deixo aqui o meu **MUITO OBRIGADO!**

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1- INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1- INSETOS DA ORDEM COLEOPTERA	2
	3
1.1.1- <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius, 1957)	5
1.2- DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM INSETOS	10
1.3- DIGESTÃO EM INSETOS	14
1.4- SEMENTES	15
1.4.1- TEGUMENTO DE SEMENTES COMO BARREIRA QUÍMICA DE DEFESA	19
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1- INSETOS	20
3.2- SEMENTES	20
3.3- FIXAÇÃO E MARCAÇÃO DOS EMBRIÕES DE <i>C. maculatus</i>	21
3.4- MARCAÇÃO DOS EMBRIÕES COM DAPI	22
3.5- SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS NATURAIS	22
3.6- EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS LARVAS	23
3.6.1- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE	23
3.6.2- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEINASES CISTEÍNICAS	24
3.6.3- ENSAIO DE ATIVIDADE DA $\alpha$ -GLUCOSIDASE	
	<b>IV</b>

3.7-MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TEGUMENTO DE <i>Phaseolus vulgaris</i> E <i>Vigna unguiculata</i>	25
3.8-SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS ARTIFICIAIS	25
<b>4- RESULTADOS</b>	<b>26</b>
4.1- DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Callosobruchus maculatus</i> SOBRE OS TEGUMENTOS <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i>	26
4.2- PERFORMANCE E SOBREVIVÊNCIA DE <i>C. maculatus</i> EM SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS NATURAIS	29
4.3- EFEITOS DOS TEGUMENTOS NATURAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> SOBRE O PROCESSO DIGESTIVO DAS LARVAS DE <i>Callosobruchus maculatus</i>	31
4.4- PERFORMANCE E SOBREVIVÊNCIA DE <i>C. maculatus</i> EM SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS ARTIFICIAIS	34
4.5- ACOMPANHAMENTO DA INGESTÃO E EXCREÇÃO DE PROTEÍNAS DO TEGUMENTO POR LARVAS DE <i>Callosobruchus maculatus</i>	38
<b>5- DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>6- CONCLUSÕES</b>	<b>45</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
<b>Figura 1:</b> Representação esquemática dos mecanismos de defesa direta e indireta em plantas	1
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do ciclo de vida do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i> .	4
<b>Figura 3:</b> Início do desenvolvimento embrionário	6
<b>Figura 4:</b> Camadas germinativas	7
<b>Figura 5:</b> Banda germinal.	8
<b>Figura 6:</b> Estágios de extensão e segmentação da banda germinal.	8
<b>Figura 7:</b> Fechamento dorsal e destino das membranas extra-embrionárias.	9
<b>Figura 8:</b> Canal alimentar de insetos	10
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática dos tecidos formadores da semente.	15
<b>Figura 10:</b> Desenvolvimento embrionário de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre os tegumentos das sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i> .	28
<b>Figura 11:</b> Final do desenvolvimento embrionário de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre os tegumentos das sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i> .	29
<b>Figura 12:</b> Performance e sobrevivência de <i>Callosobruchus maculatus</i> em sementes artificiais cobertas com tegumentos naturais de <i>Vigna unguiculata</i> (controle) e <i>Phaseolus vulgaris</i> .	31
<b>Figura 13-</b> Atividade de protease cisteínica de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> que se desenvolveram no interior de sementes artificiais cobertas com tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> ou <i>Phaseolus vulgaris</i> 15 e 20 DAO.	33
<b>Figura 14-</b> Atividade de $\alpha$ -amilase de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> que se desenvolveram no interior de sementes artificiais cobertas com tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> ou <i>Phaseolus Vulgaris</i> 15 e 20 DAO	33

<b>Figura 15-</b> Atividade de $\alpha$ -glicosidase de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> que se desenvolveram no interior de sementes artificiais cobertas com tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> ou <i>Phaseolus Vulgaris</i> 15 e 20 DAO.	34
<b>Figura 16-</b> Oviposição de fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (controle) ou <i>Phaseolus vulgaris</i> .	36
<b>Figura 17-</b> Tempo necessário (dias) para larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> atravessarem os tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (controle) ou <i>Phaseolus vulgaris</i> .	36
<b>Figura 18-</b> Sobrevivência larval de <i>Callosobruchus maculatus</i> em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (controle) ou <i>Phaseolus vulgaris</i> .	37
<b>Figura 19:</b> Massa das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> desenvolvidas em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (controle) ou <i>Phaseolus vulgaris</i> .	38
<b>Figura 20:</b> Microscopia de fluorescência de intestinos e fezes de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> que atravessaram os tegumentos artificiais.	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
cv	Cultivar
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
h	Hora
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
PBST	Tampão fosfato de sódio contendo tween 20
µm	Micrômetros
µl	Microlitros
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
TCA	Ácido trifluoracético
<i>g</i>	Força da gravidade
rpm	Rotações por minuto
mg	Miligramas
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonila
NPαGlu	p-nitrofenil-α-D-glucopiranosídeo
HAO	Horas após a oviposição
DAO	Dias após a oviposição

## RESUMO

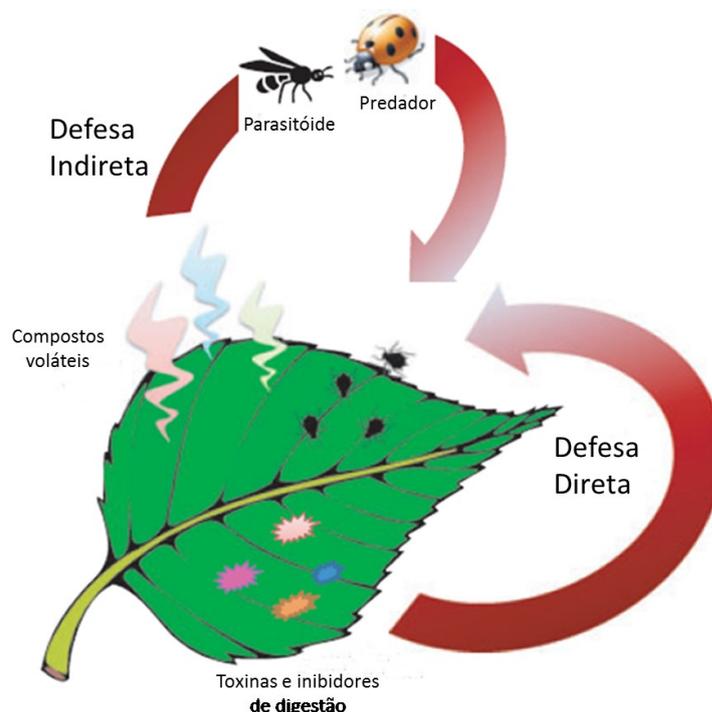
Besouros bruquídeos infestam várias sementes. O tegumento é a primeira barreira de proteção contra a infestação de bruquídeos. Embora os tegumentos de sementes não hospedeiras frequentemente interfiram com a oviposição, eclosão e sobrevivência larval do inseto *Callosobruchus maculatus*, os aspectos morfológicos e bioquímicos desse processo ainda são desconhecidos. Inicialmente nós observamos que o tegumento de *Phaseolus vulgaris* (semente não hospedeira) não causou nenhum efeito nos principais eventos do processo embrionário (formação do blastoderma celular, extensão/retração da banda germinal, segmentação do embrião, formação de apêndices e fechamento dorsal) em *C. maculatus*. Por outro lado, nós mostramos que o tegumento natural de *Phaseolus vulgaris* reduz a oviposição de fêmeas de *C. maculatus*, aumentando o tempo de penetração das larvas e comprometendo o peso corporal e a sobrevivência larval. Também foram reduzidas as atividades de proteases cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glicosidases em larvas que atravessaram o tegumento de *P. vulgaris*. Interessantemente, foi observado um efeito dose-dependente do tegumento de *P. vulgaris* sobre a oviposição, tempo de penetração, sobrevivência e peso larval de *C. maculatus*, quando diferentes concentrações desse tecido foram usadas na composição dos tegumentos artificiais. Em intestinos de larvas alimentadas com proteínas do tegumento de *P. vulgaris* marcadas com FITC foi observada uma forte fluorescência enquanto que em suas fezes foi observado um fraco sinal. O oposto foi observado quando as larvas foram alimentadas com proteínas do tegumento de *V. unguiculata* marcadas com FITC. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que embora o tegumento de *P. vulgaris* não interfira no desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*, a comprometida digestão dos alimentos claramente causou um impacto no desenvolvimento larval.

## ABSTRACT

Bruchid beetles infest various seeds. The seed coat is the first protective barrier against bruchid infestation. Although non-host seed coats often impair the oviposition, eclosion and survival of *Callosobruchus maculatus* larvae, the morphological and biochemical aspects of this phenomenon are still unclear. Initially we showed that the *Phaseolus vulgaris* seed coat caused no effect on the major events of the embryonic process (formation of the cellular blastoderm, germ band extension/retraction, embryo segmentation, appendage formation and dorsal closure) in *C. maculatus*. In other hand, we showed that the *P. vulgaris* seed coat reduces *C. maculatus* female oviposition, increases the seed penetration time and compromises larval body weight and survival. Activities of cysteine proteases,  $\alpha$ -amylases and  $\alpha$ -glucosidases in larvae that crossed the *P. vulgaris* seed coat were also reduced. Interestingly, we observed a dose-dependent effect of *P. vulgaris* seed coat on oviposition, penetration, survival and larval weight of *C. maculatus*, when different concentrations of this tissue were incorporated into seed coats. In guts of larvae fed with FITC-labeled *P. vulgaris* seed coat proteins was observed a strong fluorescence signal while in their feces weak signal was observed. The opposite was observed when larvae were fed with FITC-labeled *V. unguiculata* seed coat proteins. Taken together, our results suggest that although *P. vulgaris* seed coat does not interfere with *C. maculatus* embryonic development, a compromised food digestion led to clear impacted larval fitness.

## 1- INTRODUÇÃO

A resistência de plantas contra insetos pode ser baseada em mecanismos de defesa diretos e/ou indiretos, que podem ter origem constitutiva nos tecidos ou órgãos, formando as defesas constitutivas ou serem induzidas pelo ataque ou dano, denominadas defesas induzidas (Schoonhoven *et al.*, 2005). Defesas diretas envolvem características físicas e/ou químicas que interferem com a fisiologia e/ou comportamento do herbívoro, sendo assim o principal determinante da resistência das plantas (Figura 1). Em várias espécies de plantas, variações naturais nas características relacionadas às defesas diretas foram encontradas e isso inclui diferenças na densidade de tricomas (Kaplan *et al.*, 2009) ou na composição e quantidade de metabólitos secundários específicos (Wu *et al.*, 2008). Já as defesas indiretas são características físicas e/ou químicas da planta que interferem indiretamente no ataque do herbívoro, por exemplo, na atração dos inimigos naturais desse herbívoro, promovendo o controle populacional e consequentemente diminuindo a agressão (Schuman *et al.*, 2009; Snoeren *et al.*, 2010) (Figura 1).



**Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos de defesa diretos e indiretos em plantas.** Adaptado de Broekgaarden *et al.*, 2011.

A presença de proteínas que interferem com os processos fisiológicos de insetos tem sido uma das estratégias de defesas diretas mais eficientes usadas pelas plantas. As proteínas de plantas mais bem conhecidas como envolvidas nas defesas contra insetos são as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 1 e 2, inibidores de enzimas proteolíticas, glicoidrolases (Barbieri et al., 1993; Peumans and Van Damme, 1995; Koiwa et al., 1997), arcelinas (Osborn et al., 1988), quitinases (Herget et al., 1990; Cohen, 1993), canatoxinas (Carlini et al., 2000) e vicilinas variantes (Macedo et al., 1993; Sales et al., 2000). A maioria dessas proteínas é sintetizada constitutivamente em tecidos que são particularmente vulneráveis a ataques, como as sementes. Algumas delas podem ainda ter sua síntese induzida pelo ataque (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

Embora as plantas sejam eficientes na defesa contra a grande maioria dos agressores, relações co-evolutivas entre plantas e seus predadores herbívoros podem levar a rápidas adaptações desses insetos a esses compostos vegetais tóxicos. Sendo assim uma refinada caracterização dessa toxicidade pode nos ajudar a selecionar estratégias realmente eficientes e duradouras de proteção contra o ataque desses insetos, evitando que as próximas gerações de insetos se adaptem facilmente a essa barreira química.

### **1.1- INSETOS DA ORDEM COLEOPTERA**

Os besouros compreendem a Ordem Coleoptera (koleos=estojo, pteron=asa), com um número estimado de 350.000 a 375.000 espécies descritas em todo mundo (Pereira & Almeida, 2001). Compreendem o maior grupo conhecido de insetos, correspondendo a 40% de todas as espécies da Classe Insecta e 30% de todos os animais (Lawrence & Britton, 1991, Whiting, 2002).

Os insetos dessa ordem possuem corpo altamente esclerotizado, asas anteriores esclerotizadas e modificadas em tampas rígidas (élitros) que cobrem as asas posteriores e o corpo, asas posteriores membranosas, frequentemente reduzidas ou ausentes, peças bucais mastigadoras, antenas geralmente com oito “artículos”, protórax grande e móvel, mesotórax reduzido, abdômen

tipicamente com cinco (ou até oito) segmentos, sem ovipositor e genitália masculina retrátil (Brusca & Brusca, 2007). Os élitros são a principal característica existente nos besouros. Durante o vôo, os élitros se mantêm entreabertos e imóveis, enquanto as asas membranosas vibram. O sucesso evolutivo é atribuído, por vários autores, à presença dos élitros, que possibilitaram a exploração de diferentes nichos ecológicos (Costa, 1999).

Os coleópteros da Família Chrysomelidae, também chamados de carunchos, são as maiores pragas de legumes cultivados por se desenvolverem no interior de sementes, consumindo-as (Southgate, 1979). O consumo do interior da semente pelas larvas desses insetos compromete seu valor nutricional e comercial e seu vigor, inviabilizando-a para a germinação. Os insetos pertencentes a esta família estão relacionados com as sementes de leguminosas através de processos co-evolutivos, os quais têm permitido aos carunchos se desenvolverem mesmo em sementes que possuem várias substâncias tóxicas, sendo assim uma relação altamente específica (Sales et al., 2000).

#### **1.1.1- *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1957)**

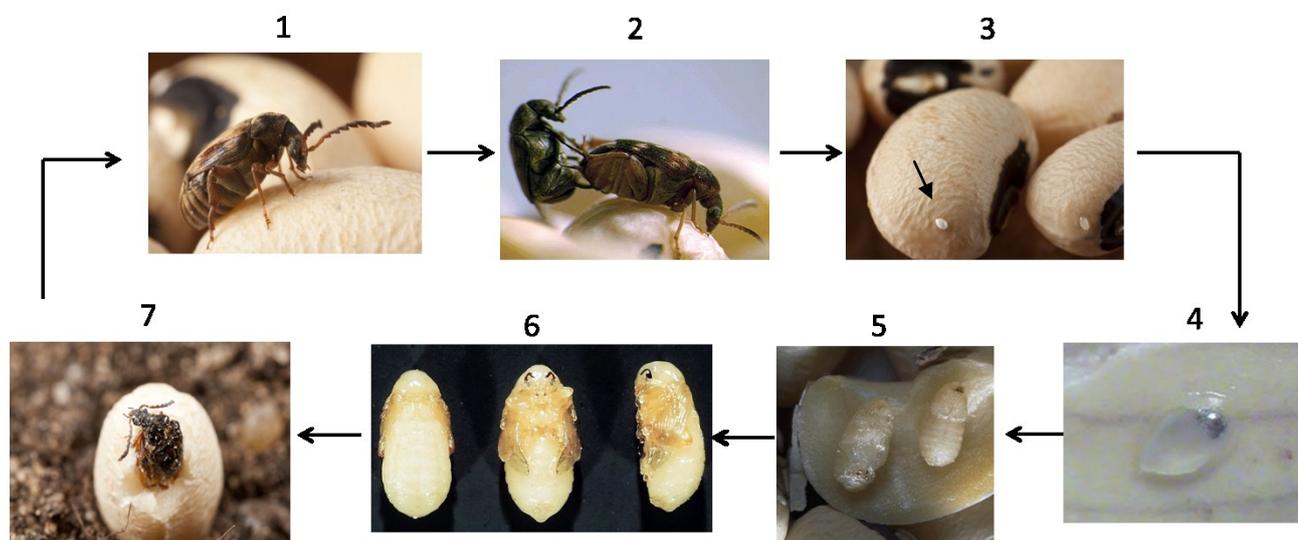
O inseto *Callosobruchus maculatus* pertence à família Chrysomelidae e a ordem Coleoptera e no Brasil se destaca como uma importante praga de feijões do gênero *Vigna* (Gallo et al., 2002). É popularmente conhecido como “caruncho” ou “gorgulho” do feijão e destaca-se como a principal praga dos grãos durante o armazenamento, embora também infeste vagens (Santos et al., 1977). Seu corpo tem um comprimento de aproximadamente 3 mm, cabeça preta com antenas contendo 11 segmentos ligeiramente serrilhados, tórax preto com pubescências douradas, apresentando nos seus élitros manchas amarronzadas, que quando em repouso, formam um “X”. O inseto se desenvolve melhor em uma temperatura de 29 °C e umidade relativa de 65%, tendo um período médio de desenvolvimento de 25 dias (Quintela et al., 1991).

As fêmeas adultas desses insetos fazem a postura na parte externa da semente, ficando o ovo aderido ao tegumento. O ovo tem cor esbranquiçada com formato subelíptico, comprimento de aproximadamente 0,5 mm e largura

de 0,3 mm (Bastos, 1981). Após o final da embriogênese a larva eclode, atravessa o tegumento e penetra na semente consumindo seu conteúdo interior (cotilédones) (Figura 2). Nos cotilédones o inseto completa seu desenvolvimento em aproximadamente 25 dias (Southgate, 1979; Credland & Dendy, 1992). No interior das sementes, as larvas crescem, transformam-se em pupas que gradativamente vão adquirindo uma cor marrom e apresentando em seus últimos estágios vestígios de asas, patas e olhos (Bastos, 1981) (Figura 2). Após virarem adultos os insetos emergem deixando galerias nas sementes e restos de excrementos (Williams, 1980; Quintela et al., 1991). Na fase adulta o inseto apresenta dimorfismo sexual, com fêmeas maiores que os machos (Quintela et al., 1991).

O ciclo de vida de *C. maculatus* pode ser dividido em sete estágios: até o 9º dia após a oviposição (DAO) temos o 1º instar, do 10º ao 13º DAO (2º instar), do 14º ao 17º DAO (3º instar), do 18º ao 20º DAO (4º instar), aos 21 DAO (pré-pupa) e aos 24 DAO (pupa) e adulto (Williams, 1980).

O inseto adulto após emergência não se alimenta, sobrevive em média uma semana e as fêmeas podem ovipositar uma média de 80 ovos durante esse tempo de vida (Gallo et al., 2002).



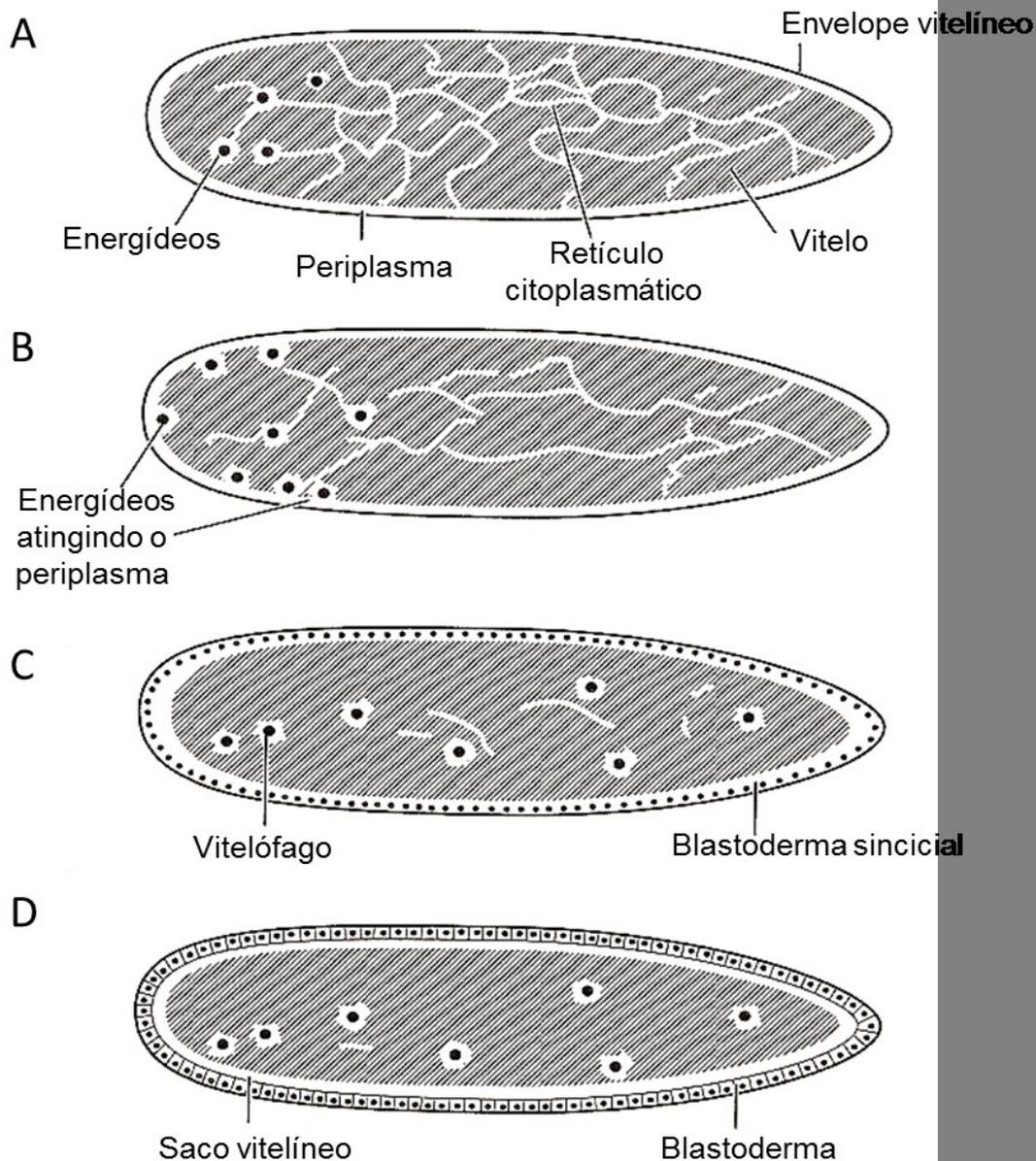
**Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do inseto *Callosobruchus maculatus*.** 1-Fêmea do inseto logo após a emergência, 2-Acasalamento, 3-Ovos ovipostos sobre a semente, indicados pela seta negra 4-Larva formada no interior do ovo, 5-Larvas se desenvolvendo no interior das sementes, 6-Pupas extraídas das sementes e 7-Inseto adulto no momento da emergência.

## 1.2- DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM INSETOS

Logo após a oviposição, o núcleo zigótico de um ovo de inseto começa a se dividir. A divisão nuclear não é seguida pela divisão celular, mas cada núcleo filho é acompanhado por um halo de citoplasma e cada unidade de halo e citoplasma é denominada de energídeo. Durante os períodos de interfase, o citoplasma dos energídeos aumenta às custas do retículo endoplasmático (Chapman, 1998) (Figura 3A). Os energídeos se movem à medida que se dividem e tornam-se arranjados em uma camada dentro do vitelo, delimitadora da massa esférica ou alongada de vitelo que corresponde aproximadamente à forma de um ovo. A migração dos energídeos continua até atingir e entrar no periplasma do ovo todo (Chapman, 1998) (Figura 3B).

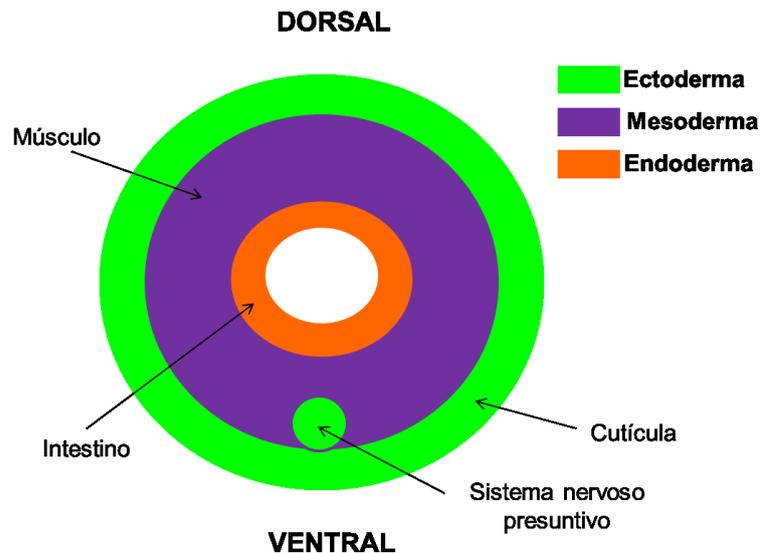
Na maioria dos insetos, nem todos os energídeos migram para a periferia, os quais alguns permanecem na massa de vitelo e irão formar vitelófagos (Chapman, 1998; Gilliot, 1985) (Figura 3C). Os vitelófagos têm uma variedade de funções. Eles são relacionados com a degradação de vitelo, engolfando-os em vacúolos (Giordi & Nordin, 1994). Posteriormente, quando o vitelo é englobado no intestino médio, os vitelófagos podem formar parte do epitélio do intestino (Chapman, 1998).

Após sua chegada ao periplasma, os energídeos continuam a se dividir, muitas vezes de forma sincronizada, até os núcleos se tornarem intimamente próximos uns aos outros, formando assim o estágio de blastoderma sincicial (Figura 3C), uma vez que membranas ainda não isolam cada núcleo (Gilliot, 1985). A transição do blastoderma sincicial para blastoderma celular ocorre quando as membranas plasmáticas migram para o interior do ovo isolando cada núcleo. Assim, forma-se o blastoderma celular, com as células organizadas na periferia e o interior ainda contendo o vitelo (Figura 3D). Esse blastoderma celular ou epitélio primário fica logo abaixo da membrana vitelínica (Foe & Alberts, 1983).



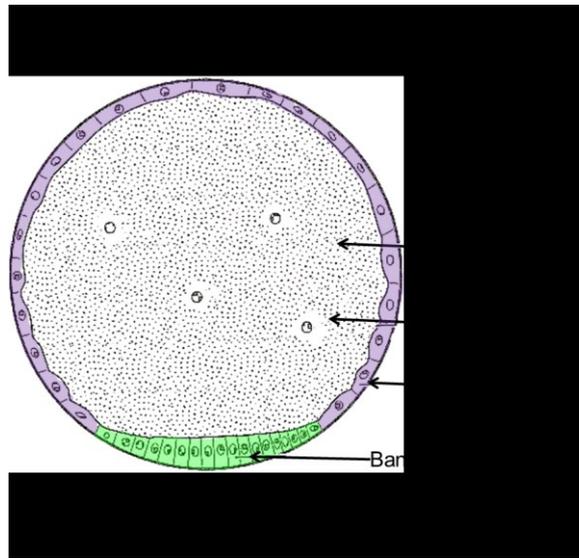
**Figura 3: Início do desenvolvimento embrionário.** Representação esquemática de um corte longitudinal de um ovo mostrando o início do desenvolvimento do embrião, resultando na formação do blastoderma. **A:** Início da migração dos energídeos, **B:** Energídeos atingindo o periplasma **C:** Formação do blastoderma sincicial e presença dos vitelófagos e **D:** Blastoderma celular já formado. Adaptado de Chapman, 1998.

Com o blastoderma celular já formado, sucedem-se dois processos simultâneos. O primeiro é a gastrulação, quando se inicia a formação do intestino e a orientação definitiva das células que irão formar as três camadas germinativas (mesoderma, ectoderma e endoderma) (Figura 4). Esse período é caracterizado por intensa migração celular (Gilbert, 2006; Wolpert 2007).

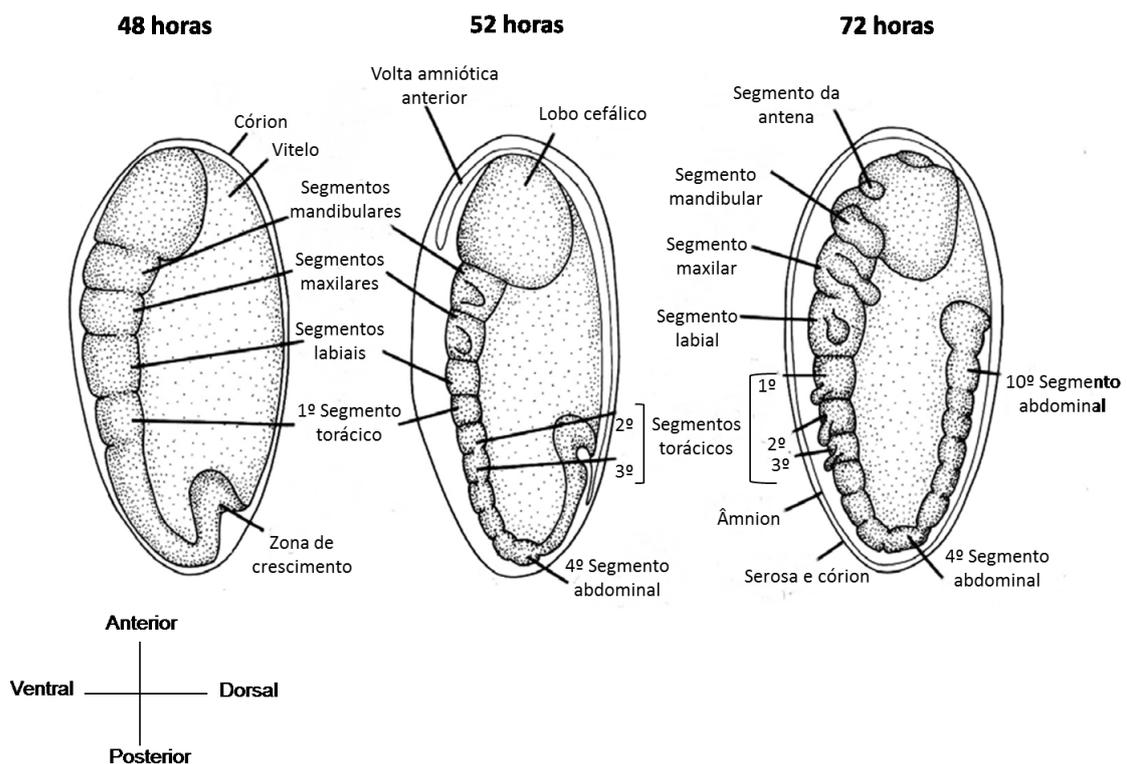


**Figura 4: Camadas germinativas.** Representação esquemática da distribuição das três camadas germinativas em um embrião de inseto. Baseado em Wolpert, 2007.

O outro evento é marcado pela definição e posicionamento das células que darão origem ao primórdio embrionário ou banda germinal e das membranas extra-embriônicas, serosa e âmnion (Clements, 1992; Goltsev et al., 2007). Durante esse evento, a parte do blastoderma localizada na região ventral do ovo sofre um espessamento devido à agregação de células de modo que elas tornam-se colunares, surgindo assim a banda germinal que dará origem ao futuro embrião (Chapman, 1998) (Figura 5). A banda germinal irá se desenvolver no futuro embrião e o restante do blastoderma, referente a região dorsal, dará origem às membranas extra-embriônicas acima mencionadas (Chapman, 1998; Gillott, 1985) (Figura 5). Após a formação da banda germinal, inicia-se um processo onde a parte mais posterior da banda germinal se estenderá dorsalmente em direção à região anterior, evento este denominado extensão da banda germinal (Figura 6). Neste mesmo momento, ocorre o crescimento da serosa, envolvendo o embrião. Na região anterior, o lobo cefálico torna-se cada vez mais evidente enquanto a banda germinal continua a se estender até quase tocá-lo (Figura 6). Nesse mesmo momento, na região ventral, já se pode observar o aparecimento de segmentos cefálicos, torácicos e abdominais (Gillott, 1985; Gilbert & Raunio, 1997; Chapman 1998) (Figura 6).



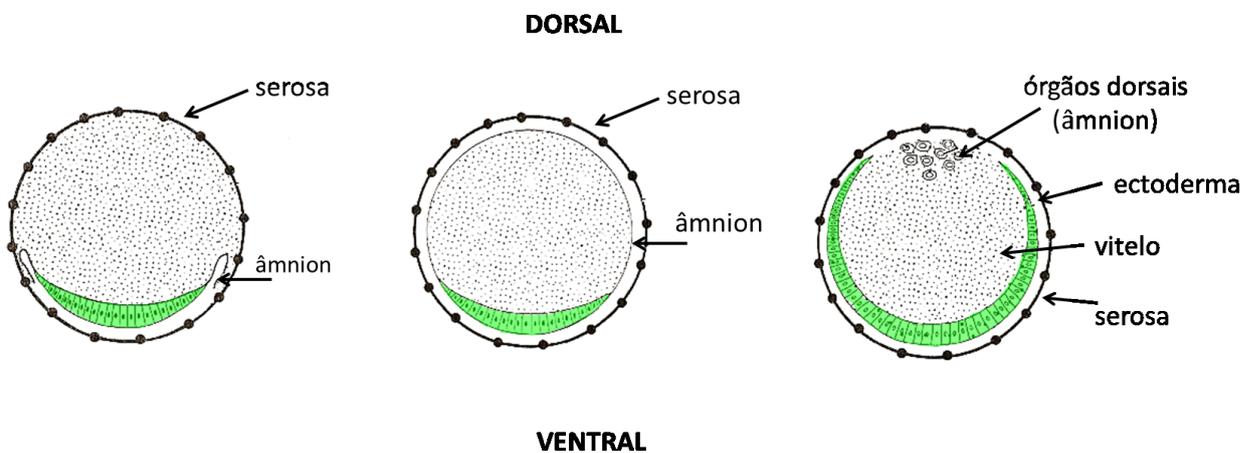
**Figura 5: Banda germinal.** Representação de um corte transversal de um ovo, mostrando a origem da banda germinal como um espessamento ventral do blastoderma. A área verde mostra a região que dará origem ao embrião (banda germinal) e a área roxa representa a região que dará origem às membranas extra-embrionárias, serosa e âmnion. Adaptado de Chapman, 1998.



**Figura 6: Estágios de extensão e segmentação da banda germinal.** Representação dos estágios de extensão e segmentação da banda germinal em *Bruchidius obtectus* com 48, 52 e 72 horas de desenvolvimento embrionário. Adaptado de Gillott, 1985.

Com a banda germinal totalmente estendida, é iniciado um evento contrário, denominado retração da banda germinal. Neste processo a região posterior, que havia ido em direção à anterior, retrai voltando a sua posição de origem. Em várias espécies de insetos, em paralelo com esse processo ocorre uma rotação do embrião em 180° sobre seu eixo longitudinal (Gillott, 1985; Chapman 1998). Finalizando a rotação do embrião, também ocorre o término da retração da banda germinal. Nesse momento é iniciado outro processo, denominado de fechamento dorsal, onde o embrião cresce lateralmente até que o vitelo seja totalmente coberto.

Em *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) e outros membros da família Chrysomelidae, durante o fechamento dorsal o âmnion se rompe e cresce interiormente à serosa (Figura 7). Posteriormente este é substituído pelo ectoderma enquanto a serosa permanece intacta do lado de fora (Chapman, 1998) (Figura 7). Após o término do fechamento dorsal e da internalização do vitelo no intestino, as estruturas larvais começam a se tornar evidentes. O fim da embriogênese se dá quando a larva já está pronta para eclodir (Gillott, 1985; Chapman, 1998).



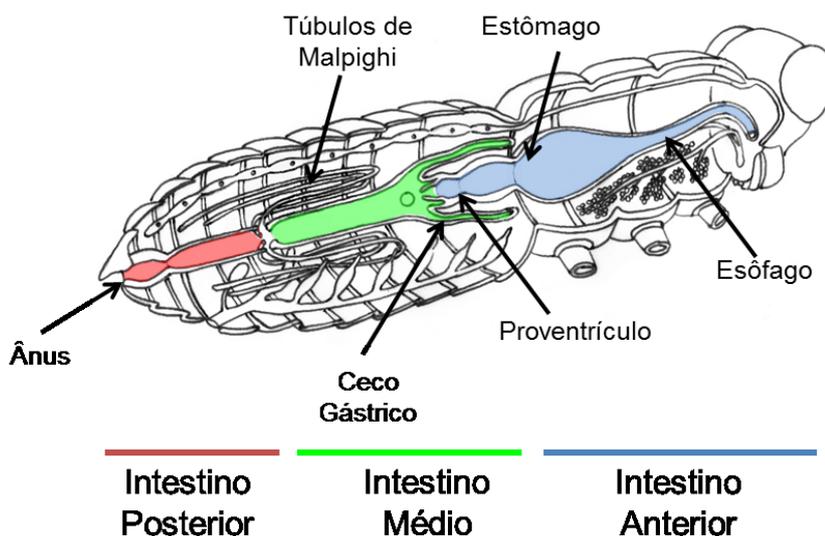
**Figura 7: Fechamento dorsal e destino das membranas extra-embrionárias.** Representação de um corte transversal, mostrando o processo de fechamento dorsal em *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) onde o âmnion forma o fechamento dorsal provisório e a serosa se mantém intacta ao redor do embrião. A área verde representa a banda germinal. Adaptado de Chapman, 1998.

### 1.3- DIGESTÃO EM INSETOS

O intestino de insetos está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo digestão de alimento, detoxificação, interação com microrganismos simbióticos e/ou hospedeiros e regulações do desenvolvimento (Nation, 2002).

O trato digestivo em insetos é formado pelo canal alimentar que percorre o corpo no sentido longitudinal desde a boca até o ânus (Figura 8). O espaço entre a parede do corpo e a parede do canal alimentar é chamado de hemocele ou cavidade geral do corpo. Esse compartimento é ocupado pela hemolinfa. O canal alimentar divide-se em três regiões principais: o intestino anterior, intestino médio e o intestino posterior. Essa divisão ocorre já durante o desenvolvimento embrionário (Gullam & Cranston, 2000).

O intestino anterior e posterior, ambos de origem ectodérmica, são revestidos por uma fina camada cuticular. Já o intestino médio tem origem endodérmica e não é revestido pela mesma camada cuticular observada nas demais regiões (Wigglesworth, 1972; Terra, 1990; Chapman, 1998).



**Figura 8: Canal alimentar de insetos.** Representação esquemática mostrando as principais subdivisões do canal alimentar de insetos. Baseado em Chapman, 1998.

Em alguns insetos, o intestino médio possui uma camada que recobre o bolo alimentar denominada membrana peritrófica (MP). A MP é uma camada acelular formada principalmente por quitina e proteínas que reveste e protege o intestino contra possíveis injúrias, mecânicas e químicas e contra a penetração de microrganismos do alimento (Chapman, 1998, Terra, 2001). Em outros insetos, como nos bruquideos *C. maculatus* e *Zabrotes Subfasciatus*, não existe uma membrana peritrófica típica. Para essas espécies foi descrita a presença de um gel peritrófico associado ao bolo alimentar. Esse gel difere da membrana peritrófica clássica em dois importantes aspectos principais: falta de resistência mecânica e diferenças nas propriedades de permeabilidade (Terra, 2001). Embora existam diferenças básicas entre o gel e a membrana peritrófica, proteínas e quitina já foram descritas como os principais constituintes também do gel peritrófico (Sales et. al., 2001).

Para insetos cuja alimentação é baseada em alimentos ricos em proteínas, como sementes de leguminosas, o metabolismo digestivo se concentra na atividade de proteases. Para obtenção dos seus aminoácidos essenciais os insetos utilizam um “pool” de atividades proteolíticas para a degradação de peptídeos e proteínas da dieta. Baseado no aminoácido funcional presente no sítio ativo, as proteases podem ser classificadas dentro de quatro grupos: 1-proteases serínicas, com um aminoácido serina e outro histidina no sítio ativo; 2-proteases cisteínicas, com uma cisteína no sítio ativo; 3-proteases aspárticas, com a presença do aspartato no sítio ativo e o 4º grupo das metaloproteases que possuem íons metálicos ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) no sítio ativo (Rao et al., 1998; Lawrence & Koundal, 2002; Yousef et al., 2003). A utilização dessas enzimas é importante não só para digestão do alimento, mas também para facilitar na penetração dos tecidos vegetais, no caso de insetos herbívoros (Castro & Fontes, 2005).

Enquanto insetos das ordens Diptera e Lepidoptera possuem intestinos alcalinos, utilizando assim principalmente proteases serínicas para a digestão de seu alimento (Haq et al., 2004), os representantes da ordem Coleoptera, cujos intestinos tem pHs mais ácidos, utilizam principalmente proteases cisteínicas e aspárticas em seus processos digestivos (Murdock et al., 1987).

Embora não se destaquem como atividades digestivas principais, carboidrases também têm funções importantes na digestão dos insetos bruquídeos. Glicosídeses, como as amilases e as glicosídeses, já são descritas como essenciais na digestão para algumas espécies de bruquídeos, sendo também estudadas como alvos potenciais para o controle desses bruquídeos (Lemos et al., 1990; Shade et al., 1994; Grossi de-Sá & Chrispeels, 1997; Silva et al., 1999; Pedra et al., 2003).

As amilases são enzimas que fazem a quebra das ligações  $\alpha$ -1,4 do amido e outros carboidratos, originando oligossacarídeos simples como a maltose (dissacarídeo) (Terra e Ferreira, 1994). As glicosídeses catalisam a hidrólise de resíduos glicosil individuais de vários glico-conjugados. Podem ser classificadas em  $\alpha$  ou  $\beta$  de acordo com o tipo de ligação alvo. As  $\alpha$ -glicosídeses possuem várias propriedades similares entre as ordens de insetos (Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e Lepdoptera) das quais já foram purificadas e caracterizadas (Terra e Ferreira, 1994; Erthal et al., 2004).

Devido à ampla gama de funções desempenhadas pelos componentes do trato intestinal de insetos, vários estudos se concentram em investigar as modificações nesse sistema em resposta a diferentes alimentos. Outro foco de estudos é a identificação de toxinas de plantas que tenham como alvos componentes desse sistema digestório (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). Visto que essas atividades digestivas são indispensáveis ao desenvolvimento larval e conseqüentemente a sobrevivência, compostos vegetais que interfiram nessas atividades podem ser potencialmente letais ao inseto (Sales et al 2001).

Inúmeros trabalhos têm mostrado a influencia negativa de inibidores de proteases de leguminosas sobre o desenvolvimento de insetos, inclusive sobre bruquídeos (Gatehouse et al., 1985; Kitch & Murdock, 1986; Silva & Xavier-Filho, 1991; Silva et al ., 2001; Pedra et al., 2003; Chi et al., 2009).

Estudos sobre a expressão de genes em intestinos de insetos têm recebido atenção especial nos últimos anos. Transcriptomas intestinais de várias espécies de insetos foram realizados na ultima década, incluindo vetores sugadores de sangue como *Lutzomyia longipalpis* (Dillon et al., 2006; Jochim et

*al.*, 2008) e *Phlebotomus papatasi* (Ramalho-Ortigao et al., 2007) e insetos que se alimentam de plantas como *Callosobruchus maculatus* (Pedra et al., 2003; Chi et al., 2009), *Ostrinia nubilalis* (Goates et al., 2008; Khajuria et al., 2009), *Epiphyas postvittana* (Simpson et al., 2007), *Myzus persicae* (Ramsey et al., 2007), *Acyrtosiphon pisum* (Sabater-Munoz et al., 2006), e *Hodotermopsis sjostedti* (Yuki et al., 2008). Pedra et al. (2003) identificaram cerca de 30 genes que podem estar envolvidos na quebra de alimentos no inseto *C. maculatus*. Dentre esses se destacam genes que codificam proteases cisteínicas e aspárticas, além de amilases. Trabalhos mais recentes têm se concentrado na caracterização de variações proteômicas e transcriptômicas no intestino de insetos em resposta a mudanças na composição alimentar. Chi et al., (2009) mostraram a super expressão de algumas proteínas, incluindo carboidrases no trato intestinal de *C. maculatus* alimentados com uma dieta que continha cistatina de soja (inibidor de proteinases cisteínicas), mostrando que as larvas são capazes de desencadear respostas moleculares compensatórias que podem levar a uma adaptação às mudanças alimentares. Nogueira et al., (2012) também mostraram que a ingestão de cistatina por larvas de *C. maculatus* causou mudanças no perfil proteico do epitélio intestinal do inseto. Atividade de  $\alpha$ -amilase e proteinases cisteínicas também foram alteradas em respostas ao inibidor (Nogueira et al., 2012). Tentativas para o uso de um único inibidor de protease em plantas transgênicas tiveram um sucesso muito limitado. Os insetos rapidamente se adaptaram à presença do inibidor na dieta e essa adaptação reduziu consideravelmente a vida útil das plantas transgênicas (Cloutier et al., 2000; Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001; Zhu-Salzman et al., 2003). Reunir múltiplos genes de defesa em uma só planta pode ser uma estratégia promissora para aumentar a resistência à insetos e a vida útil de plantas resistentes (Estruch et al., 1997; Abdeen et al., 2005; Christou et al., 2006). Embora muitos avanços tenham sido obtidos no sentido de se entender a fina interação inseto-planta, a comprovação do desencadeamento no inseto de respostas moleculares compensatórias que culminam com adaptação de insetos à presença de toxinas de plantas, mostram que estudos mais minuciosos são necessários para a seleção de estratégias realmente eficientes e duradouras de proteção.

## 1.4- SEMENTES

A semente é um órgão de propagação, com uma posição importante no processo evolutivo das plantas superiores, sendo suas características fisiológicas de suma importância para o sucesso do novo indivíduo. Nela é armazenada a informação genética necessária para perpetuação da espécie e também reservas capazes de sustentar a plântula nos estágios iniciais de desenvolvimento até que esta desenvolva a capacidade de realizar a fotossíntese e assim sintetizar compostos orgânicos para a formação de novos órgãos e tecidos (Bewley & Black, 1994).

As sementes são formadas por três tipos de tecido: tecido meristemático, tecido de reserva e o de proteção (Figura 9). O tecido meristemático ou eixo embrionário é importante por promover o crescimento dos eixos nos sentidos da raiz e caule, resultando em uma plântula com condições de se fixar e fotossintetizar. O tecido de reserva pode ser formado pelo endosperma, pelo (s) cotilédono (s) e em alguns casos pelo perisperma e é rico em proteínas, carboidratos e lipídios. O tecido de proteção, também conhecido como tegumento ou casca protege o embrião contra danos mecânicos, além de controlar processos fisiológicos como a germinação e a dormência das sementes (Copeland, 1980).

A grande diversidade de nutrientes presentes nas sementes faz com que ela seja um ótimo alimento para boa parte dos seres vivos, incluindo pestes e patógenos, sendo assim alvo preferencial de ataque. Sementes são incapazes de disparar mecanismos de defesa induzidos pelo ataque, sendo assim são as principais fontes de defesa constitutiva das plantas (Xavier-Filho, 1993). Nesse tipo de defesa estão presentes desde estruturas físicas como pêlos, tricomas e espinhos, até substâncias químicas onde se destacam metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, aminoácidos não proteicos, etc e muitas macromoléculas como proteínas e carboidratos (Xavier-Filho, 1993, Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).



**Figura 9: Representação esquemática dos tecidos formadores da semente. A:** Tecido meristemático **B:** Tecido de reserva **C:** Tecido de proteção. Adaptado de <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/semente/semente.php>.

#### **1.4.1-TEGUMENTO DE SEMENTES COMO BARREIRA QUÍMICA DE DEFESA**

O tegumento é a estrutura externa que delimita a semente, sendo um tecido exclusivamente materno, desenvolvido a partir dos integumentos do óvulo. As etapas do desenvolvimento do tegumento têm profundos efeitos na estrutura final, composição e função, bem como no padrão de maturação desse tecido (Moise et al., 2005). Este tecido apresenta características variáveis em relação à textura, coloração, porosidade, espessura e dureza. Sua composição é extremamente variada, podendo conter várias substâncias do metabolismo secundário como taninos, fenóis, ceras, pigmentos, e ainda inibidores de germinação, carboidratos solúveis e insolúveis e proteínas. A quantidade e qualidade dessas substâncias também variam enormemente de espécie para espécie (Moise et al., 2005).

O tegumento foi inicialmente descrito como uma estrutura envolvida apenas com a função de proteção mecânica do embrião (Kozlowski, 1972), entretanto com o decorrer dos anos, novas funções foram atribuídas a esse tecido, como promover o direcionamento de nutrientes para o embrião durante a embriogênese (Weber et al., 2005), controlar processos de dormência/germinação e assim determinar as condições adequadas para viabilidade e crescimento do novo indivíduo (Bewley, 1997).

O tegumento, por ser uma cobertura externa, é a primeira parte das sementes que entra em contato com possíveis agressores. Esses tecidos podem ser duros e espessos, e por essa razão acreditava-se que esse tecido estivesse envolvido exclusivamente em mecanismos de defesa física do embrião. A hipótese de que compostos químicos poderiam estar envolvidos na resistência dessas sementes a patógenos veio com estudos feitos com *Callosobruchus maculatus*, infestando 73 sementes de diferentes espécies. Nesse estudo foi analisada a relação entre espessura e dureza do tegumento com a sobrevivência e penetração das larvas durante os primeiros estágios de desenvolvimento do inseto. Os resultados mostraram uma alta mortalidade das larvas em sementes com tegumentos muito finos, enquanto larvas tiveram êxito em sobreviver e penetrar em sementes com tegumentos muito espessos e duros (Janzen, 1977). Desta forma, foi mostrado não haver relação direta entre as propriedades físicas do tegumento com a resistência das sementes. Um trabalho posterior mostrou altas variações na mortalidade no primeiro estágio de desenvolvimento do inseto *Acanthoscelides obtectus* em alguns cultivares de *Phaseolus vulgaris* com tegumentos finos e pouco duros (Thiery, 1984).

Trabalhos realizados pelo nosso grupo mostraram a presença de proteínas no tegumento de *Canavalia ensiformes* (Oliveira et al., 1999), *Phaseolus lunatus* (Moraes et al., 2000) e *Phaseolus vulgaris* (Silva et al., 2004) similares a vicilinas (proteínas de reserva do tipo globulinas 7S) que foram tóxicas a *C. maculatus*. Também do tegumento de *C. ensiformes*, foi isolado um carboidrato tóxico, de massa molecular de 883,0 Da, formado por unidades de ramnose unidas por ligações do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) com ramificações de galactose com ligações do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (Oliveira et al., 2001).

Compostos tóxicos capazes de inibir o desenvolvimento de *C. maculatus* e o crescimento de fungos fitopatogênicos foram isolados do tegumento de soja (*Glycine max*) (Santos et al, 2008). Na fração antifúngica obtida dos tegumentos de soja, tóxicas para os fungos fitopatogênicos *Fusarium lateritium* e *Fusarium oxysporum* constatou-se a presença de peroxidase, vicilina e uma proteína de 24 kDa homóloga a fosfatase ácida. Frações contendo quitinases e vicilinas desses tegumentos também mostraram-se tóxicas ao inseto *C. maculatus* e inibiram o crescimento dos fungos filamentosos *Colletotrichum musae*, *Rhizoctonia fragariae* e *Trichoderma pseudokoningii* (Conceição, 2008).

Em outro trabalho, estudando sete cultivares diferentes de *Glycine max*, nosso grupo mostrou a influência dos tegumentos dessas sementes na capacidade de penetração, desenvolvimento e sobrevivência das larvas do inseto *C. maculatus*. Nossos resultados mostraram que a oviposição foi drasticamente reduzida, chegando a 100% de inibição no cultivar Tucunaré. A eclosão larval também sofreu sérias reduções, chegando a 82,5% para o cultivar Conquista. Esses resultados mostraram não haver nenhuma correlação entre espessura, coloração ou textura dos tegumentos com a habilidade da larva em atravessá-los. Atrasos de até 116% no tempo necessário para que a larva atravessasse o tegumento e alcançasse os cotilédones também foram observados. Em experimentos com sementes artificiais cobertas com tegumentos naturais foi observado que as larvas sobreviventes tiveram reduções de 34 % nas suas massas, quando comparadas com larvas que atravessaram os tegumentos de sementes hospedeiras. A incorporação da farinha desses tegumentos em sementes artificiais mostrou  $WD_{50}$  (dose que reduz a massa larval para 50%) em torno 1,5%, indicando uma alta toxicidade dessas farinhas (Oliveira et al., 2009).

Tentando entender a relação entre toxicidade de tegumentos a insetos com os processos de domesticação das sementes, o nosso grupo estudou a interferência dos tegumentos de sementes cultivadas dos feijões comuns *Phaseolus vulgaris* (cultivares manteiga, vermelho e manteiga-vermelho), *Phaseolus lunatus*, e *Vigna angularis* em comparação com tegumentos de sementes selvagens (silvestres) de *Canavalia ensiformis*, *Adenanthera pavonina*, *Albizia sp*, *Bauhinia variegata*, *Peltogyne gracilipes*, *Clitoria*

*fairchildiana*, *Dioclea altissima*, *Caesalpinia ferrea*, *Galactia latisiliqua*, *Macroptilium bracteatum*, *Sesbania virgata*, *Tephrosia adunca* e *Vigna vexilata*. Esses resultados mostraram que as propriedades tóxicas desses tecidos independem da domesticação, pois sementes cultivadas e extremamente utilizadas na alimentação humana, como os feijões comuns do gênero *Phaseolus*, apresentaram tegumentos extremamente tóxicos para o inseto *C. maculatus* (Souza et al., 2011). Observando-se o comportamento das larvas neonatais foi possível verificar uma alta porcentagem de larvas que morreram dentro do ovo, retardos no desenvolvimento larval durante a travessia pelo tegumento, além de problemas de aderência dos ovos. Experimentos com sementes artificiais mostraram, que mesmo em sementes onde 93% das larvas foram capazes de atravessar os tegumentos, essas larvas apresentavam reduções de 50% em suas massas (Souza et al., 2011).

Recentemente, em outro trabalho do nosso grupo, foi demonstrado que o tegumento de *Albizia lebbbeck* comprometeu drasticamente a oviposição, eclosão e o desenvolvimento do bruquídeo *C. maculatus*. Ainda neste mesmo trabalho, foram isoladas, deste mesmo tegumento vicilinas, com propriedade de ligação à quitina, que em concentrações de 0,1% causaram uma redução de aproximadamente 78% no peso de larvas de *C. maculatus* (Souza et al., 2012).

Embora esses trabalhos tenham avançado no sentido de confirmar as evidências do poder protetor dos tegumentos contra a penetração do inseto e ainda a participação de moléculas tóxicas nessa defesa, ainda não conseguimos identificar os mecanismos de toxicidade desses tegumentos para esse inseto e nem caracterizar as alterações morfológicas e bioquímicas sofridas pelas larvas que consumiram esses tecidos.

## 2- OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar a interferência do tegumento de *Phaseolus vulgaris* (cultivar vermelho) sobre a oviposição, eclosão, sobrevivência e o desenvolvimento embrionário e larval do inseto *Callosobruchus maculatus*, comparando com seu desenvolvimento em sementes hospedeiras de *Vigna unguiculata* (cultivar fradinho).

### Objetivos Específicos

- Descrever e analisar o desenvolvimento embrionário do inseto *C. maculatus* sobre os diferentes tegumentos;
- Acompanhar a oviposição, eclosão, sobrevivência e a massa das larvas de *C. maculatus* em sementes artificiais cobertas por tegumentos naturais;
- Avaliar a atividade das enzimas digestivas: proteases cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glucosidases em larvas de *C. maculatus* após a travessia dos tegumentos;
- Avaliar o efeito dose-dependente dos tegumentos sobre a oviposição, eclosão, sobrevivência e massa das larvas de *C. maculatus*;
- Avaliar a ingestão e excreção de proteínas dos tegumentos pelas larvas do inseto *C. maculatus*.

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1-INSETOS**

Os insetos *Callosobruchus maculatus* foram obtidos a partir de uma colônia mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos-LQFPP desta Universidade. As larvas foram mantidas em sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) em frascos de vidro transparente de boca larga fechados com tampas plásticas perfuradas. Os frascos foram mantidos em câmaras de crescimento a temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65%. A cada geração de insetos emergidos, novas sementes foram infestadas com fêmeas de dois dias de idade por um período de 24 horas.

#### **3.2-SEMENTES**

As sementes de *Vigna unguiculata*, (cv. fradinho) e *Phaseolus vulgaris* (cv. vermelho) foram obtidas comercialmente no mercado central da Cidade de Campos dos Goytacazes-RJ.

#### **3.3- FIXAÇÃO DOS EMBRIÕES DE *C. maculatus***

Para obtenção de embriões de *C. maculatus* e posterior descrição de seu processo embrionário, inicialmente sementes de *V. unguiculata* ou *P. vulgaris* foram infestadas com fêmeas de dois dias de idade durante 4 horas a uma temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65%. Do lote de sementes infestadas foram retirados aproximadamente 70 gramas em intervalos de 12 h até um total de 88 horas após a oviposição (HAO). Cada alíquota de 70 g foi colocada em um frasco contendo 100 ml de cloro comercial (2-2,5% de hipoclorito de sódio). O frasco foi tampado e agitado levemente por 30 segundos. Nesse procedimento ocorre a digestão do exocórrion (camada mais externa da casca do ovo) pelo cloro fazendo com que os ovos se desgrudem das sementes. Os ovos foram recuperados com o auxílio de uma peneira (Falcon cell strainer-70 µm Nylon mesh, Becton Dickinson). As sementes foram

lavadas sucessivas vezes com água e os ovos remanescentes recuperados como descrito acima.

Os ovos adquiridos foram retirados da peneira com o auxílio de um pincel e colocados em frascos contendo uma solução fixadora formada por 3,8 ml PBST (tampão fosfato de sódio 0,15M pH 7,6 + 0,05 % Tween 20), 1,2 ml de formaldeído 37% e 5 ml heptano. O frasco foi agitado em uma plataforma rotatória a 220 rpm por 1h. Após um repouso de 5 minutos, foi observada a formação de duas fases na solução contida no tudo. A fase inferior (contendo PBST e formaldeído) foi retirada e 8 ml de metanol resfriado a -20 °C foram adicionados ao tubo, seguido de agitação manual vigorosa por 40 segundos. A solução foi removida e os ovos agora fixados foram lavados com metanol por três vezes.

Ao final da fixação e das lavagens com metanol, boa parte dos embriões ainda encontrava-se no interior dos ovos, por isso com intuito de separa-los das cascas, os microtubos foram mergulhados em nitrogênio líquido por 10 segundos e agitados vigorosamente. Este procedimento foi repetido duas vezes.

### **3.4- MARCAÇÃO DOS EMBRIÕES COM DAPI**

Para possibilitar a visualização ao microscópio de fluorescência, os embriões foram marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), corante fluorescente que marca núcleos celulares. Para isso, primeiramente os embriões foram reidratados gradualmente com PBST, seguidos de três lavagens com mesmo tampão. Após isso, DAPI foi adicionado aos embriões imersos em PBST em uma concentração final de 5 µg/ml e incubados por 15 minutos. Passado esse tempo, os embriões marcados foram lavados novamente com PBST e analisados ao microscópio de fluorescência.

Os estágios embrionários foram identificados de acordo com a literatura (Kerkurt & Gilbert, 1985; Gilbert & Raunio, 1997; Chapman, 1998).

### **3.5-SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS NATURAIS**

Para a verificação da eficácia dos tegumentos como estruturas de proteção à penetração dos insetos, foram feitas sementes artificiais recobertas com pedaços de tegumentos naturais segundo metodologia descrita por Souza et al. (2011). As sementes foram preparadas com farinha de cotilédones de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho). Primeiramente, 50 mg da farinha foram adicionados no fundo de um molde cilíndrico e sobre ela foi colocado um pedaço de tegumento de semente natural de fradinho (controle) ou de *P. vulgaris* (cv. vermelho) com sua face externa voltada para baixo. Posteriormente, mais 450 mg de farinha de cotilédones de fradinho foram colocados sobre o pedaço de tegumento (sobre a face interna) e o molde cilíndrico foi prensado em prensa manual. A semente artificial foi então retirada do molde e os 50 mg inicialmente colocados no molde foram retirados até a exposição da face externa do tegumento. As partes da semente não revestidas pelo tegumento foram protegidas com parafilme e fêmeas de 2 dias de idade foram colocadas para ovipositar sobre as sementes durante 24 h. Após esse tempo, as sementes foram desinfestadas e o número total de ovos postos sobre o tegumento foi contado. O excesso de ovos sobre os tegumentos foi removido com o auxílio de uma agulha fina deixando-se apenas 3 ovos por semente. As sementes foram incubadas a 28 °C em estufa incubadora e 15 e 20 dias após a oviposição (DAO), as mesmas foram desfeitas para a retirada das larvas. O número de larvas sobreviventes e as suas massas foram determinadas e comparadas com as larvas desenvolvidas nas sementes controle (sementes contendo tegumento de *V. unguiculata*, cv. fradinho).

### **3.6- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS LARVAS E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS**

As larvas foram maceradas em tampão PBS (fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 500 mM pH 7,6) na proporção de 100 µL/larva. As amostras foram agitadas por 30 minutos a 4 °C e centrifugadas por 5 minutos a 1700 x g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante usado para dosagem de proteínas e determinação das atividades de  $\alpha$ -amilases e proteases cisteínicas.

### **3.6.1-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE $\alpha$ -AMILASE**

A determinação da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi feita através da metodologia descrita por Miller (1959), com modificações. Para a realização do ensaio foi utilizado o reativo de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico).

O ensaio foi constituído de 44  $\mu$ L do extrato + 6  $\mu$ L de uma solução de amido 1 %. Foram feitos três brancos: o branco do reagente DNS (50  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio); o branco da solução de amido 1 % (44  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio, 6  $\mu$ L da solução de amido 1 %) e os brancos das amostras (50  $\mu$ L de cada amostra). Os tubos contendo essas soluções foram incubados a 37 °C por 45 minutos e após esse período foi aguardado o resfriamento das soluções e a essas foram então adicionados 100  $\mu$ L do reativo de DNS. Em seguida, as soluções foram fervidas durante 5 minutos e mais 100  $\mu$ L de água destilada foram acrescentados a cada amostra. Um volume de 200  $\mu$ L das amostras foi transferido para uma placa de cultura de células para ser lido em um leitor de microplacas, no comprimento de onda de 540 nm. Para quantificar a atividade de  $\alpha$ -amilases nas amostras, foi feita uma curva padrão utilizando maltose.

### **3.6.2- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES CISTEÍNICAS**

O ensaio de atividade de proteases cisteínicas foi baseado na metodologia desenvolvida por Michaud *et al.*, (1994) usando-se azocaseína (indicado para proteinases cisteínicas semelhantes à papaína) como substrato. Foi feita uma curva padrão de papaína, usando-se a azocaseína em pH 5,6. Para obtenção da curva, papaína foi diluída na proporção de 1mg para 2mL de tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio monobásico 100 mM, Triton X-100 0,1 %, DTT 1,5 mM, pH 5,6) obtendo-se uma solução com uma concentração final de papaína de 500  $\mu$ g/mL. Azocaseína foi preparada a uma concentração de 1% em tampão citrato-fosfato. O ensaio foi preparado com quantidades crescentes (1; 2; 4; 8; 10; 12; 14; 16; 18 e 20  $\mu$ L) da solução da papaína, 80  $\mu$ L da solução de azocaseína 1% e tampão citrato-fosfato para completar um volume final de 120  $\mu$ L. O período de incubação foi de 1 hora em banho-maria a 37 °C. Em seguida, a reação foi parada com 300

$\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 10%. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a  $3000 \times g$  e  $350 \mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio, onde ainda foram adicionados  $300 \mu\text{L}$  de NaOH 1 M. A leitura foi feita em comprimento de onda de 440 nm. Os ensaios de atividade de proteinase cisteínica foram feitos nas amostras de larvas extraídas com PBS. A reação foi realizada incubando-se  $80 \mu\text{L}$  da solução azocaseína 1% com  $30 \mu\text{L}$  dos extratos das larvas e  $10 \mu\text{L}$  de tampão citrato-fosfato. Os passos seguintes foram feitos como descrito acima. A concentração da atividade de proteases cisteínicas nas amostras foi calculada com base na curva padrão de papaína.

### **3.6.3- ENSAIO DE ATIVIDADE DE $\alpha$ -GLUCOSIDASES**

Para a determinação da atividade de  $\alpha$ -glucosidases, as larvas foram maceradas em água destilada e submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e maceração. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a  $18000 \times g$  após cada ciclo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado diluído em uma solução de 0,1% NP-40, fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, imidazol 5 mM, PMSF (Flúor fenilmetanossulfonil) e benzamidina 1mM. As amostras foram incubadas por 12 h sob agitação a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguido por centrifugação a  $18000 \times g$  por 30 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante final foi usado nos experimentos.

As proteínas extraídas foram incubadas com o substrato de  $\alpha$ -glucosidase, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (NP $\alpha$ Glu) 5 mM, em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5. Para  $25 \mu\text{L}$  das amostras diluídas 5 vezes foram usados  $25 \mu\text{L}$  do substrato. A reação foi realizada a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo adicionados  $200 \mu\text{L}$  de tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,2 após 15, 30, 45 e 60 minutos do início das reações, com intuito de parar as mesmas. A atividade de  $\alpha$ -glucosidase foi medida indiretamente pela quantificação do produto resultante da hidrólise de NP $\alpha$ Glu (Terra et al., 1979), o p-nitrofenolato, que absorve luz em 410 nm.

### **3.7- MARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS TEGUMENTOS COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA (FITC)**

Sementes de *P. vulgaris* (cv. vermelho) foram descascadas e os tegumentos foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de um grau e pistilo. As proteínas da farinha foram extraídas em tampão bicarbonato de sódio (0,75 M, pH 9,5) sob agitação e refrigeração durante 1h. O extrato foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C e a quantificação de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976). Uma solução de FITC diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) foi misturada com o extrato dos tegumentos (sobrenadante + precipitado) na proporção de aproximadamente 5 mg de FITC para 1 mg de proteína. A mistura foi agitada levemente por 1h a temperatura ambiente e posteriormente dialisada contra água por 24 h a 4°C. Após a retirada do FITC livre por diálise a amostra foi liofilizada e a farinha marcada resultante foi utilizada para a confecção dos tegumentos artificiais.

### **3.8-SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS ARTIFICIAIS**

No intuito de avaliar a ingestão e a excreção de proteínas do tegumento pelas larvas do inseto, foram feitas sementes artificiais contendo tegumentos artificiais confeccionados com diferentes concentrações (0, 5, 10, 20, 40, 100%) da farinha marcada com FITC. Cada semente consistiu de 400 mg de farinha de cotilédone de *V. unguiculata* (cotilédone artificial) e 20 mg de tegumento artificial (resultante da mistura de farinhas de tegumento de *V. unguiculata* ou *P. vulgaris* marcadas com FITC com farinha do cotilédone de *V. unguiculata*). Os 20 mg da mistura para confecção do tegumento marcado foram colocados no fundo de um molde cilíndrico e sobre ele foram colocados os 400 mg da farinha de cotilédone de *V. unguiculata*. O molde cilíndrico foi prensado com auxílio de uma prensa manual e posteriormente a semente artificial contendo o tegumento artificial foi retirada do molde. As partes da semente que não possuíam o tegumento artificial foram protegidas com parafilme e as sementes foram infestadas com fêmeas de 2 dias de idade por 24 h. O excesso de ovos foi retirado deixando-se apenas 3 ovos sobre o

tegumento artificial. O desenvolvimento dos ovos foi acompanhado até a total travessia das larvas no tegumento artificial.

## **4- RESULTADOS**

### **4.1- DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Callosobruchus maculatus* SOBRE OS TEGUMENTOS *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris***

Para avaliarmos possíveis influências do tegumento de *P. vulgaris* sobre o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*, inicialmente foi necessário descrever esse processo quando o ovo do inseto se desenvolve sobre sementes hospedeiras (*V. unguiculata*), visto que até o momento não se encontra essa descrição na literatura.

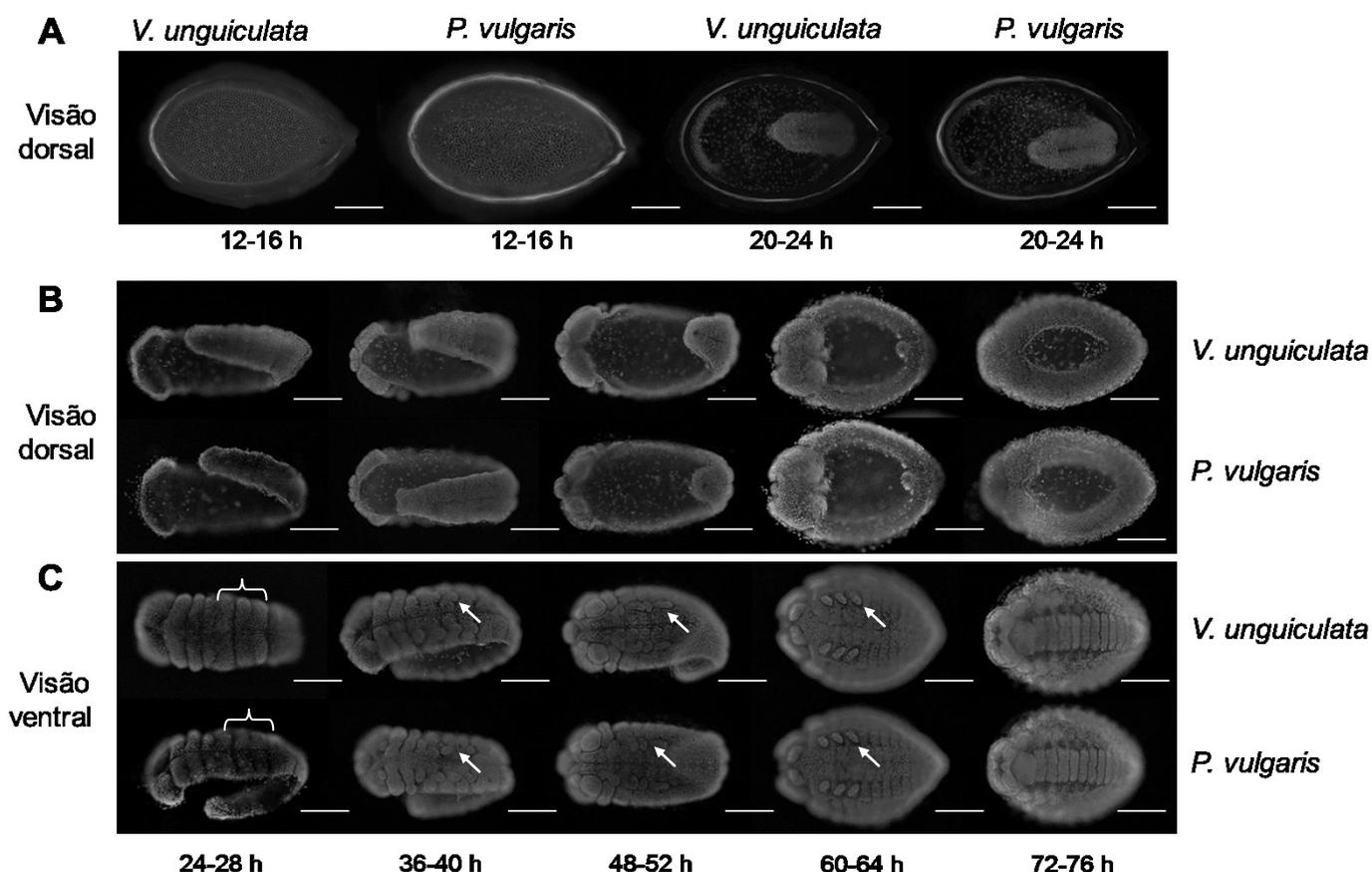
O acompanhamento do desenvolvimento embrionário foi registrado de 12 até 88 HAO (horas após a oviposição) (Figuras 10 e 11). A figura 10A mostra o desenvolvimento de embriões dentro dos ovos (visão dorsal) e as figuras 10B e 10C mostram embriões fora dos ovos (visão dorsal e ventral, respectivamente).

Até 24 horas após a oviposição, só foi possível a visualização dos embriões na visão dorsal devido impossibilidade de remoção das cascas dos ovos. Após 24 de oviposição foi possível a remoção das cascas e conseqüentemente a possibilidade da obtenção de imagens na visão ventral e dorsal.

Durante as 12-16 HAO o desenvolvimento embrionário encontrava-se no estágio de blastoderma celular (Figura 10A). Em 20-24 HAO o processo de extensão da banda germinal já era observado nos embriões que já se encontravam aproximadamente na metade deste evento. O processo de extensão da banda germinal é um evento comum durante a embriogênese de insetos, caracterizado pela extensão da região posterior do embrião em direção à região anterior. Desenvolvimento semelhante foi observado quando os ovos de *C. maculatus* se desenvolveram sobre os tegumentos de *P. vulgaris* (Figura 10A), indicando que esse tegumento não provocou alteração no desenvolvimento embrionário até 24 HAO.

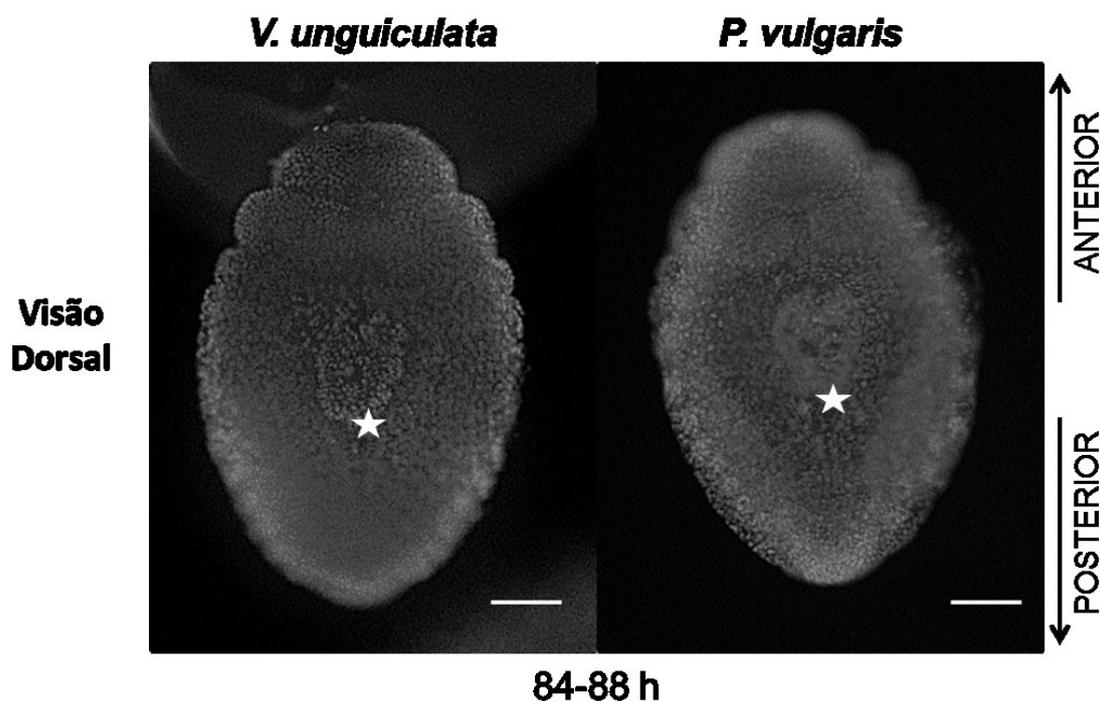
No intervalo de 24-28 HAO os embriões já concluíram o processo de extensão da banda germinal e se apresentavam na transição entre o final da extensão e o início do processo de retração da banda germinal (Figura 10B). O processo de retração da banda germinal é marcado pela retração da parte posterior que foi inicialmente estendida em direção à parte anterior do embrião.

A retração da banda germinal foi completada entre 36 e 52 HAO (Figura 10B). Durante os processos de extensão/retração da banda germinal, ventralmente pode ser observado o aparecimento cada vez mais definido dos segmentos torácicos e os apêndices das patas (indicados pelas setas brancas na Figura 10C).



**Figura 10: Desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre os tegumentos das sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*. Microscopia ótica de fluorescência (DAPI) do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* de 16 a 24h (A), 24 a 76h (B e C). Os tempos em h indicam horas após a oviposição (HAO). A: visão dorsal dos embriões dentro dos ovos; B: visão dorsal dos embriões fora dos ovos; C: visão ventral dos embriões fora dos ovos. Chaves brancas destacam os segmentos torácicos e setas brancas apontam os apêndices de patas. Barra de escala = 50  $\mu$ m.**

No período de 60 a 88 HAO os embriões encontravam-se no processo de fechamento dorsal, quando as células do vitelo da região dorsal são cobertas por células embrionárias (Figura 10B e 11). O término do fechamento dorsal aconteceu no período de 84-88 HAO (Figura 11). Entretanto ainda foi possível observar uma pequena parte do vitelo exposta na região dorsal (Figura 11 estrela branca). O final da embriogênese, definido na literatura como o momento em que a larva eclode de dentro do ovo, para os embriões de *C. maculatus* aconteceu com 5 dias após a oviposição (DAO), em ambas as sementes.



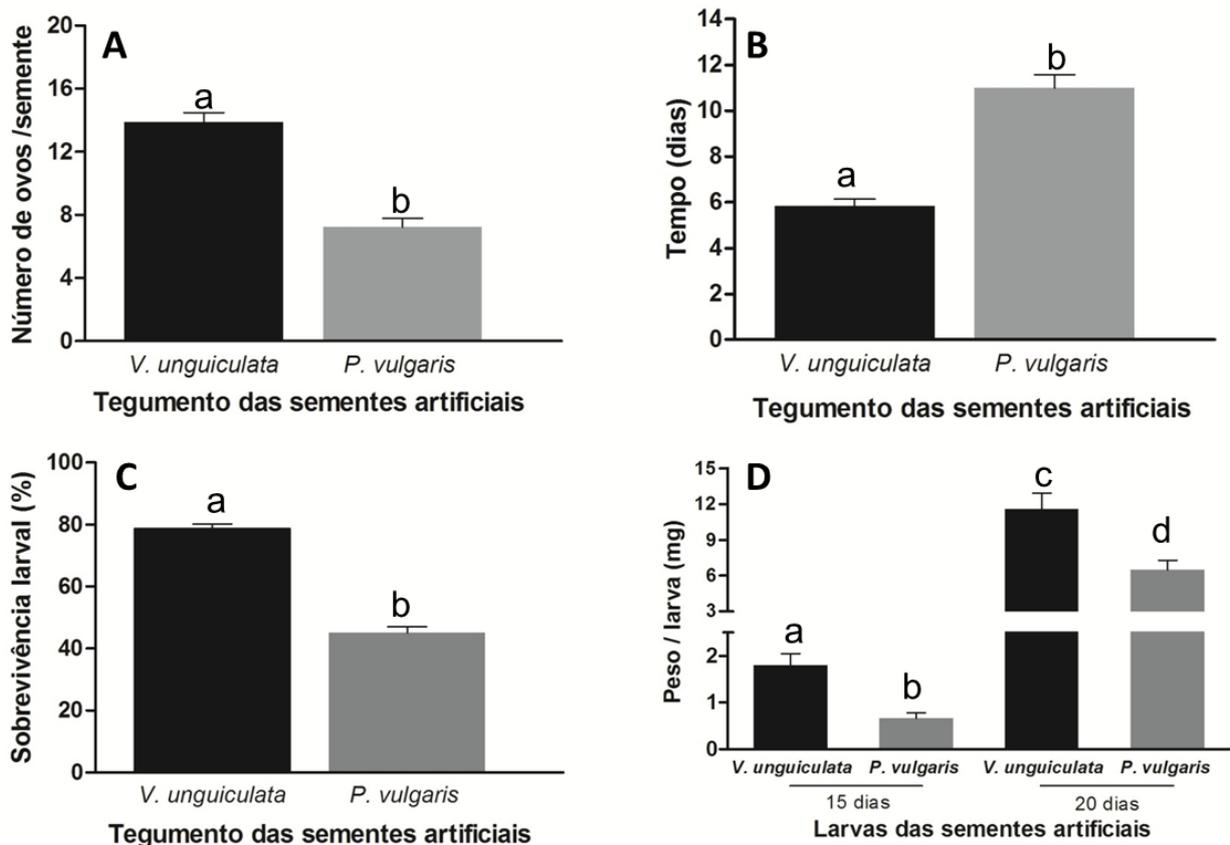
**Figura 11: Final do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre os tegumentos das sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*.** Microscopia ótica de fluorescência de embriões de *C. maculatus* (visão dorsal) com 84-88 horas de desenvolvimento. Os tempos em h indicam horas após a oviposição (HAO). Estrelas brancas indicam pequena parte do vitelo ainda exposta ao final do fechamento dorsal. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

Quando comparados os processos embrionários do inseto *C. maculatus* sobre os tegumentos de *V. unguiculata* (semente hospedeira) e *P. vulgaris* nenhuma alteração foi observada (Figuras 10 e 11).

#### 4.2- PERFORMANCE E SOBREVIVÊNCIA DE *C. maculatus* EM SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS NATURAIS

No intuito de demonstrar a interferência do tegumento de *P. vulgaris* sobre o desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* foram feitas sementes artificiais cobertas com pedaços de tegumentos naturais. Os resultados mostraram que após 24 horas de infestação o número de ovos postos sobre o tegumento de *P. vulgaris* diminuiu aproximadamente 47% (média de 7,22 ovos/semente) quando comparado com o número de ovos postos no controle (sementes contendo tegumento de *V. unguiculata*) onde a média foi de 13,88 ovos/semente (Figura 12A). Com o término do processo embrionário, as larvas já formadas começaram o processo de travessia através do tegumento das sementes com o intuito de atingir os cotilédones. Nessa fase foi observado que as larvas necessitaram de um tempo 83% maior para atravessar o tegumento de *P. vulgaris* (11 dias) em comparação ao tempo para atravessar o tegumento controle que foi de 6 dias (Figura 12B).

Completados 20 dias após a oviposição (DAO), as sementes foram abertas e as larvas sobreviventes foram computadas. Das larvas que atravessaram o tegumento de *V. unguiculata* observamos uma taxa de sobrevivência de 78%, enquanto que apenas 47% das larvas que cruzaram o tegumento de *P. vulgaris* permaneciam vivas, refletindo em uma redução de aproximadamente 40% na sobrevivência larval (Figura 12C). As massas das larvas sobreviventes à travessia do tegumento de *P. vulgaris* sofreram reduções de 62,9 % e 43,9%, em 15 e 20 DAO, respectivamente (Figura 12D). Esses resultados demonstram que embora 60% das larvas tenham tido sucesso na travessia do tegumento de *P. vulgaris* e sobrevivido até 20 DAO a massa corporal dessa larva foi extremamente comprometida (Figura 12D).



**Figura 12: Performance e sobrevivência de *Callosobruchus maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumentos naturais de *Vigna unguiculata* (controle) e *Phaseolus vulgaris*. A-** número de ovos postos sobre os tegumentos após 24 horas de infestação. **B-** Tempo necessário (dias) para as larvas atravessarem os tegumentos; **C-** Porcentagem de sobrevivência de larvas 20 DAO (dias após a oviposição); **D-** Massa das larvas (mg) 15 e 20 DAO. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3- EFEITOS DOS TEGUMENTOS NATURAIS DE *Phaseolus vulgaris* SOBRE O PROCESSO DIGESTIVO DAS LARVAS DE *Callosobruchus maculatus*

Como mostrado nos resultados anteriores, larvas de *C. maculatus* com 15 e 20 DAO que se desenvolveram em sementes contendo o tegumento de *P. vulgaris* tiveram significantes reduções nas massas corpóreas, sugerindo uma interferência na alimentação larval. No intuito de comprovar se essa toxicidade tem como alvo a digestão larval, a atividade de importantes enzimas digestivas, como proteases cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glucosidases, foi medida nas larvas sobreviventes (Figuras 13 - 15).

As dosagens de atividade de proteases cisteínicas mostraram que em larvas com 15 DAO, provenientes dos experimentos com tegumento de *P. vulgaris*, a atividade foi 55% menor (0,35  $\mu\text{g}/\text{mg}$  larva) do que das larvas controle (0,8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  larva). Em larvas com 20 DAO ainda observa-se uma redução, porém com valores inferiores (20%) (Figura 13).

No período entre 15 e 20 DAO os níveis de atividade das proteases cisteínicas nas larvas que se desenvolveram nas sementes controle aumentaram aproximadamente 2 vezes (0,8 para 1,58  $\mu\text{g}/\text{mg}$  larva) enquanto que em larvas que atravessaram o tegumento de *P. vulgaris*, neste mesmo período tiveram seus níveis aumentados em aproximadamente quatro vezes (Figura 13). Esse expressivo aumento natural de atividade pode justificar a diminuição no potencial de inibição provocado pelos tegumentos de *P. vulgaris* nas larvas de 20 DAO (Figura 13).

Reduções na atividade amilásica também foram observadas em larvas que atravessaram o tegumento de *P. vulgaris*. Em larvas com 15 e 20 DAO observamos reduções de 28,5% e 21,8% respectivamente (Figura 14). Semelhante ao observado para a atividade de proteases cisteínicas, também notamos um expressivo aumento da atividade de  $\alpha$ -amilase entre o 15 e 20 DAO. Esse aumento foi de aproximadamente duas vezes nas larvas que atravessaram o tegumento de *V. unguiculata* e de 2 vezes nas que atravessaram os tegumentos de *P. vulgaris* (Figura 14).

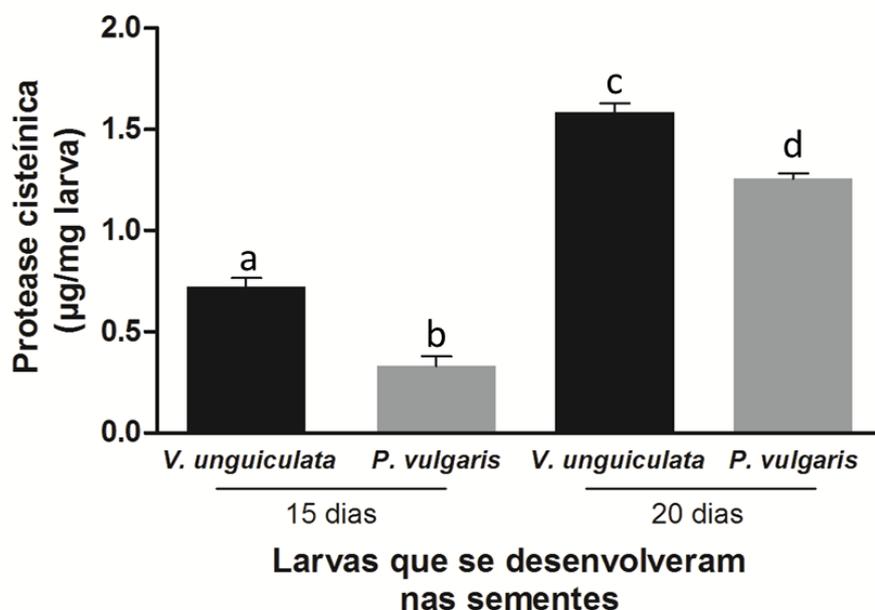


Figura 13- Atividade de proteases cisteínicas de larvas de *Callosobruchus maculatus* que se desenvolveram no interior de sementes artificiais cobertas com tegumentos de *Vigna unguiculata* ou *Phaseolus vulgaris* 15 e 20 DAO. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

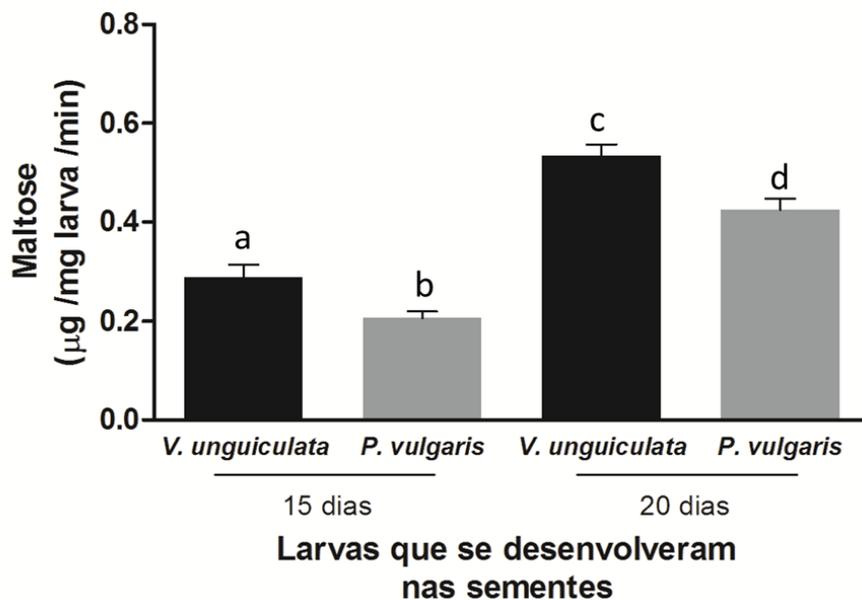
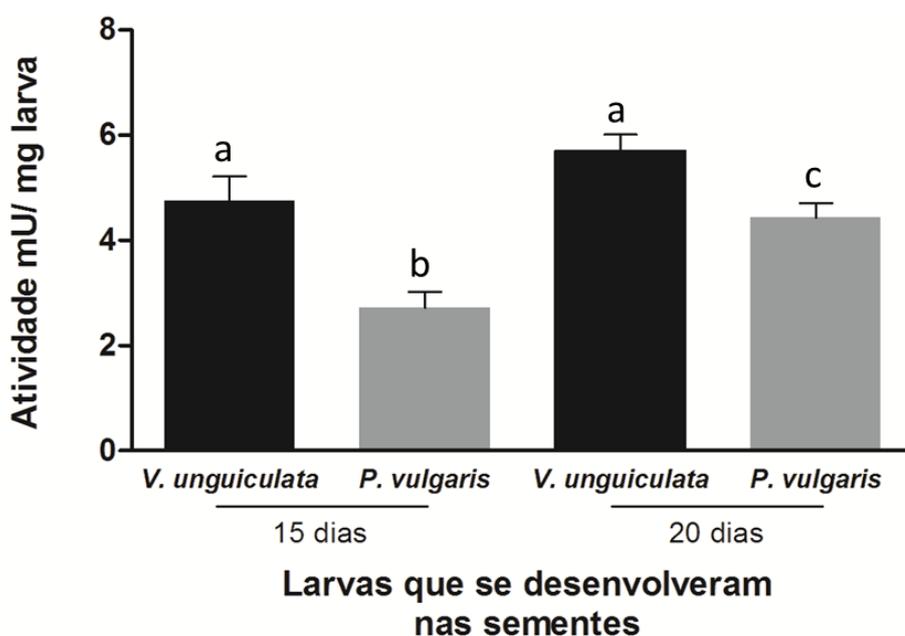


Figura 14- Atividade de  $\alpha$ -amilases de larvas de *Callosobruchus maculatus* que se desenvolveram no interior de sementes artificiais cobertas com tegumentos de *Vigna unguiculata* ou *Phaseolus vulgaris*, 15 e 20 DAO. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

A atividade de  $\alpha$ -glucosidases de larvas com 15 DAO que atravessaram os tegumentos de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* foram de 4,75 e 2,70 mU/mg larva respectivamente, significando uma redução de aproximadamente 43%. Redução também foi observada em larvas com 20 DAO, onde as que atravessaram o tegumento de *V. unguiculata* tiveram uma atividade de 5,70 mU/mg larva e as que atravessaram o tegumento de *P. vulgaris* mostraram uma atividade de 4,42 mU/mg larva, redução de 22,4% (Figura 15).



**Figura 15-** Atividade de  $\alpha$ -glucosidases de larvas de *Callosobruchus maculatus* que se desenvolveram no interior de sementes artificiais cobertas com tegumentos de *Vigna unguiculata* ou *Phaseolus vulgaris* 15 e 20 DAO. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Assim como observado para as demais enzimas, os níveis de atividade de  $\alpha$ -glucosidases foram bem maiores nas larvas de 20 DAO (Figura 15), mostrando que nesse estágio de desenvolvimento o potencial digestivo das larvas é bem mais significativo. Mesmo com essas atividades aumentadas em 20 DAO, o tegumento de *P. vulgaris* foi capaz inibir parcialmente essas

atividades. Essa inibição das principais atividades digestivas das larvas pode justificar a redução do ganho de peso corporal dessas larvas.

#### **4.4- PERFORMANCE E SOBREVIVÊNCIA DE *C. maculatus* EM SEMENTES ARTIFICIAIS COBERTAS COM TEGUMENTOS ARTIFICIAIS**

A fim de avaliar se a interferência do tegumento de *P. vulgaris* no desenvolvimento das larvas está relacionada às suas propriedades físicas ou a presença de compostos químicos, adaptamos o protocolo de sementes artificiais, agora cobertas por um tegumento artificial composto de farinha de cotilédones e diferentes concentrações de farinhas de tegumento de *V. unguiculata* (controle) ou *P. vulgaris*. Para comprovar a ingestão e facilitar o acompanhamento da travessia dessas farinhas nas larvas, proteínas desses tegumentos foram marcadas com FITC.

Inicialmente foi avaliada a influência dos tegumentos artificiais sobre a oviposição de fêmeas de *C. maculatus* (Figura 16). Em tegumentos artificiais contendo 0, 5, 10, 20 e 40% de farinha de tegumento de *V. unguiculata* não foram observadas alterações significativas na oviposição. Por outro lado, as concentrações de 5, 10, 20% de farinha de tegumento de *P. vulgaris* causaram redução de 52 % na oviposição. Um efeito ainda mais acentuado, 70% de redução, foi observado na concentração de 40% (Figura 16).

O tempo necessário para que as larvas recém-eclodidas atravessassem os tegumentos artificiais também foi avaliado (Figura 17). Em todas as concentrações de tegumento de *V. unguiculata*, as larvas conseguiram atravessar completamente os tegumentos artificiais com aproximadamente 6 DAO. Um efeito semelhante foi observado em 5% de tegumento de *P. vulgaris*, entretanto nas concentrações superiores (10 a 40%) as larvas necessitaram aproximadamente de 8 a 10 dias para a total travessia do tegumento artificial (Figura 17).

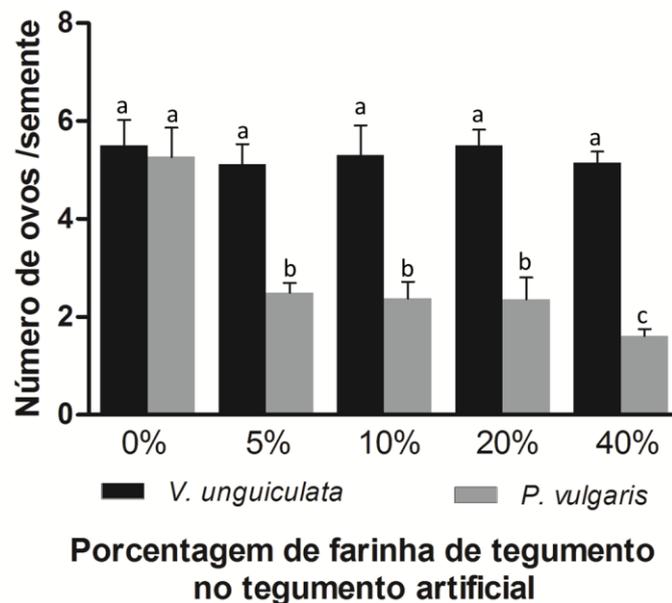


Figura 16- Oviposição de fêmeas de *Callosobruchus maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de *Vigna unguiculata* (controle) ou *Phaseolus vulgaris*. Média do número de ovos postos após 24 de infestação. Os resultados representam médias de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

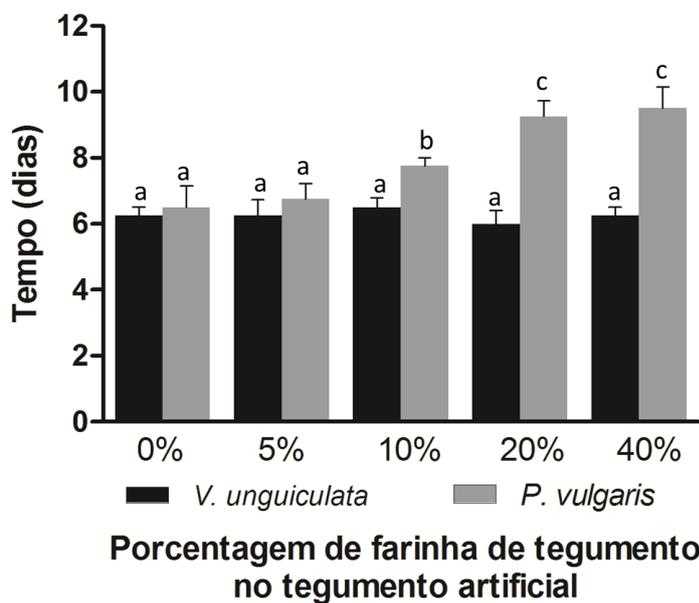
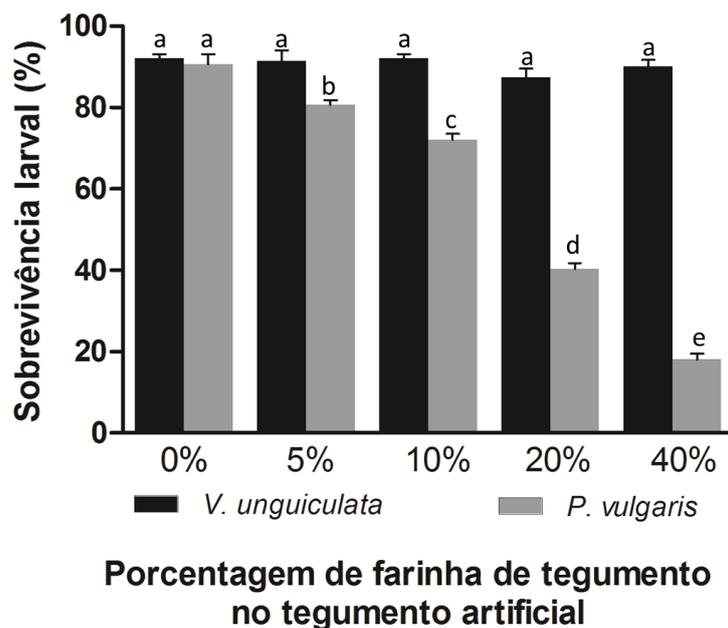


Figura 17- Tempo necessário (dias) para larvas de *Callosobruchus maculatus* atravessarem os tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de *Vigna unguiculata* (controle) ou *Phaseolus vulgaris*. Os resultados representam médias de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

A sobrevivência larval foi avaliada 20 DAO (Figura 18). Foi observado que em todos os experimentos controle o índice de sobrevivência das larvas foi de aproximadamente 90%. Já nos tegumentos artificiais contendo 5, 10, 20 e 40% de farinha de tegumento de *P. vulgaris* foram observadas reduções de 10, 20, 55 e 80%, respectivamente, nas sobrevivências das larvas (Figura 18).

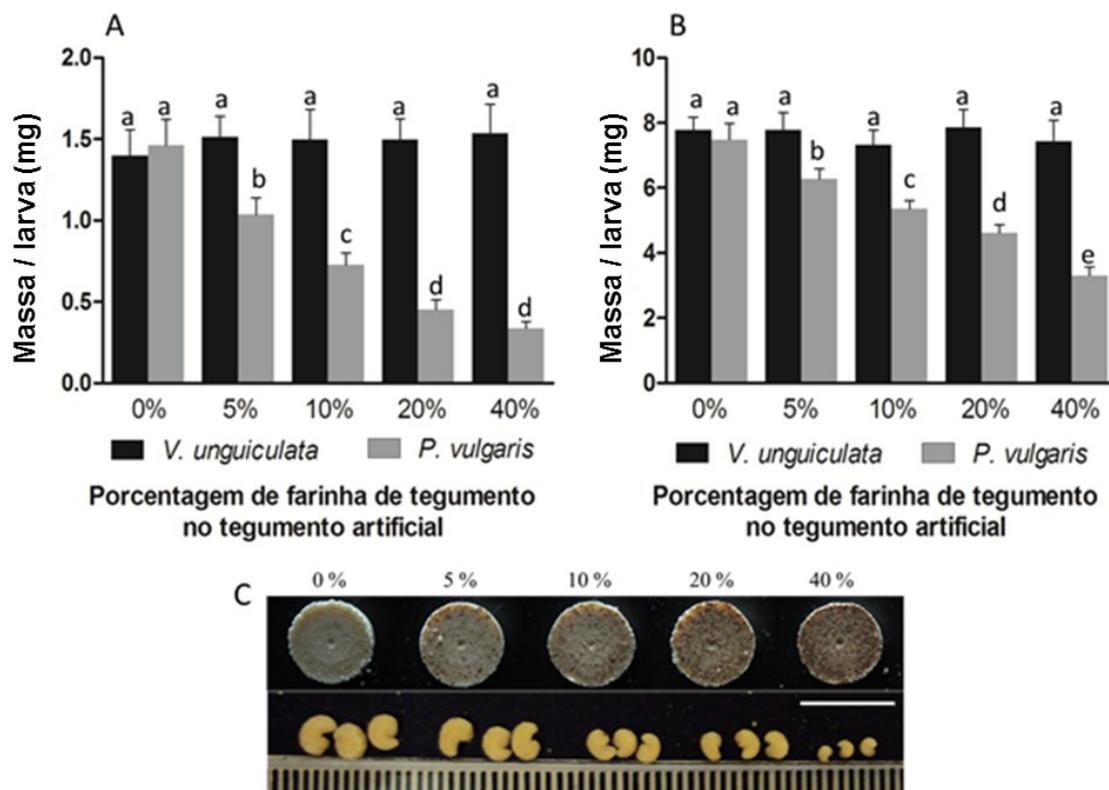


**Figura 18- Sobrevivência larval de *Callosobruchus maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de *Vigna unguiculata* (controle) ou *Phaseolus vulgaris*. O percentual de larvas vivas foi calculado 20 DAO. Os resultados representam médias de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).**

Nos períodos de 15 e 20 DAO sementes artificiais, cobertas com os tegumentos artificiais, foram desfeitas e a massa das larvas sobreviventes foi averiguada (Figura 19). Larvas controle de 15 DAO não sofreram nenhuma redução significativa em sua massa corpórea, enquanto na presença de 5, 10, 20 ou 40% da farinha de tegumento de *P. vulgaris* foram observadas diminuições de aproximadamente 30, 50, 70 e 70%, respectivamente, nas

massas das larvas (Figura 19A). Um semelhante padrão dose-dependente de diminuição de massa corpórea foi observado nas larvas de 20 DAO com reduções de aproximadamente 15, 30, 40 e 55% (Figura 19B e 19C).

Esse conjunto de resultados comprova que a toxicidade desses tegumentos não está relacionada à dureza ou espessura do tecido e apontam um potencial de defesa química do tegumento de *P. vulgaris* contra *C. maculatus*.



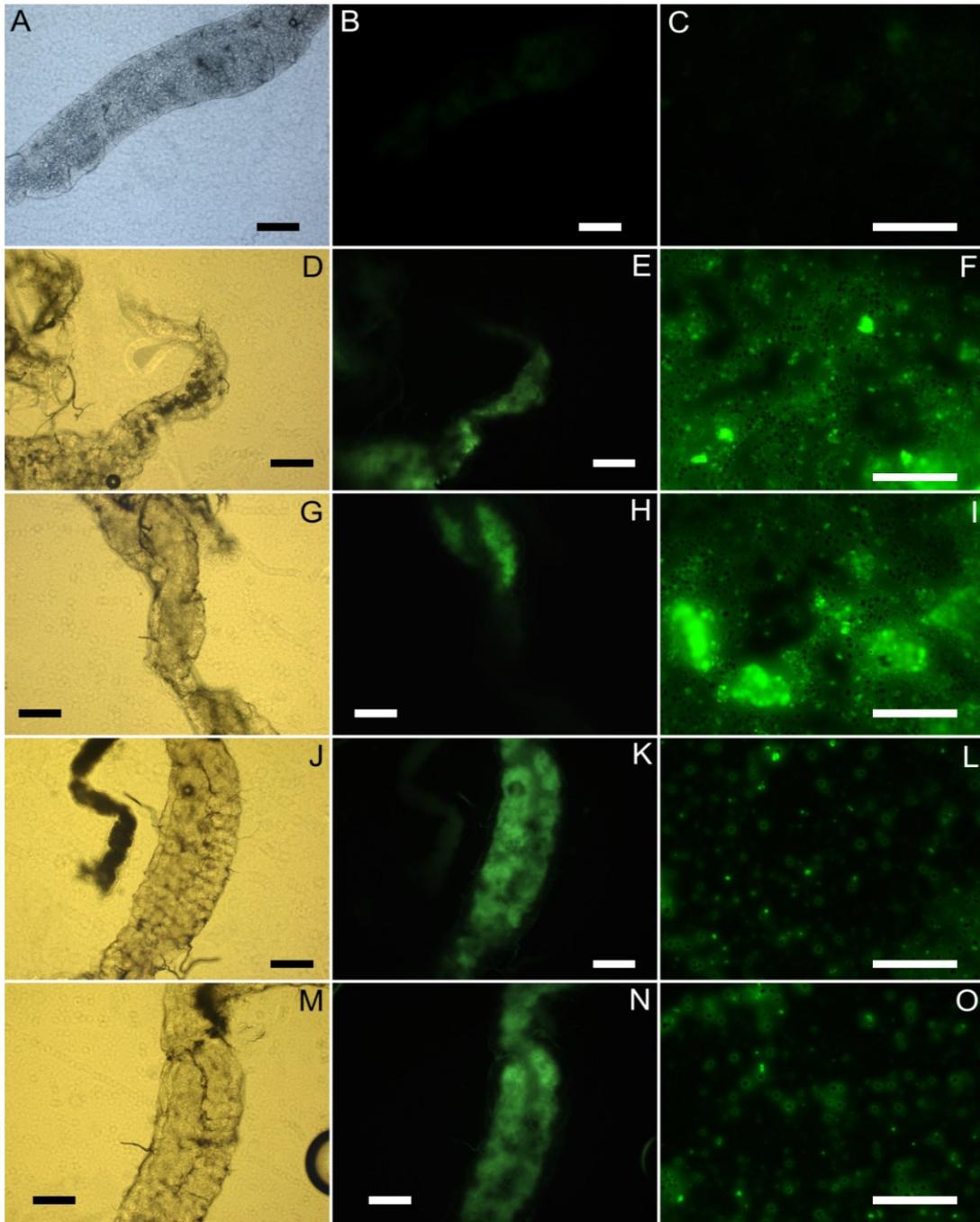
**Figura 19: Massa das larvas de *C. maculatus* desenvolvidas em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo concentrações diferentes de farinha de tegumento de sementes de *V. unguiculata* (controle) ou *P. vulgaris*. As larvas foram pesadas com 15 (A) e 20 (B) dias após a oviposição. C mostra larvas extraídas de sementes com tegumento artificial de *P. vulgaris*. Os resultados representam médias de 3 experimentos independentes. Diferentes letras minúsculas significam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barra = 1cm.**

#### 4.5- ACOMPANHAMENTO DA INGESTÃO E EXCREÇÃO DE PROTEÍNAS DO TEGUMENTO POR LARVAS DE *Callosobruchus maculatus*

Com a finalidade de comprovar a ingestão e avaliar a excreção de proteínas dos tegumentos pelas larvas do inseto *C. maculatus*, intestinos e fezes de larvas de 15 e 20 DAO, provenientes de sementes artificiais cobertas com tegumento artificial contendo 10% de farinha de tegumento de *V. unguiculata* ou *P. vulgaris* marcadas com FITC, foram analisados por microscopia de fluorescência (Figura 20).

Inicialmente avaliamos a presença de auto fluorescência utilizando intestinos de larvas 15 DAO que se desenvolveram em sementes artificiais cujos tegumentos artificiais não continham farinha fluorescente. Nenhuma marcação foi observada nos intestino ou fezes dessas larvas (Figura 20A-C). Larvas de 15 e 20 DAO provenientes das sementes com tegumentos artificiais de *V. unguiculata* marcados com FITC apresentaram fluorescências no trato intestinal (Figura 20E e H) e, aparentemente mais forte, nas fezes (Figura 20F e I). As larvas de mesma idade, provenientes dos experimentos com farinha de tegumento de *P. vulgaris* marcada com FITC, também apresentavam fluorescência em seus intestinos (Figura 20K e N), porém com uma intensidade visualmente mais forte do que a encontrada nas larvas controle (Figura 20E e H). Em contrapartida a fluorescência nas fezes dessas larvas foi visivelmente menor (Figura 20L e O) do que das larvas controle (Figura 20F e I).

Com esses resultados, pode-se perceber que as proteínas de ambos os tegumentos foram ingeridas, ainda estavam presentes no trato intestinal de larvas de 15 e 20 DAO e parte desse material é excretado nesse período. Observações da intensidade do sinal em larvas provenientes dos experimentos com tegumentos de *P. vulgaris* indicam uma maior quantidade desse material marcado no intestino (Figura 20 K e N) e uma menor quantidade de material excretado nas fezes (Figura 20L e O), apontando para uma provável retenção desse material no trato intestinal dessas larvas.



**Figura 20: Microscopia de fluorescência de intestinos e fezes de larvas de *C. maculatus* que atravessaram os tegumentos artificiais. A-C:** larvas de 15 DAO que se desenvolveram em sementes artificiais cujos tegumentos artificiais não continham farinha fluorescente. **D-F:** larvas de 15 DAO e **G-I** larvas de 20 DAO provenientes dos experimentos contendo 10% de farinha marcada com FITC de tegumento de *V. unguiculata*. **J-L:** larvas de 15 DAO e **M-O** larvas de 20 DAO provenientes dos experimentos contendo 10% de farinha marcada com FITC de tegumento de *P. vulgaris*. **A, D, G, J e M:** campo claro. **B, E, H, K e N:** Fluorescência no trato intestinal. **C, F, I, L, e O:** Fluorescência nas fezes. Barras = 100  $\mu$ m.

## 5- DISCUSSÃO

O tegumento é a primeira parte da semente a entrar em contato com o agressor, inclusive com insetos bruquídeos. Assim, durante muitos anos a dureza e a espessura desses tecidos foram destacados como os principais atributos que influenciavam no sucesso da penetração das larvas desses insetos (Kozlowski, 1972). Um dos primeiros estudos a levantar a possibilidade da importância dos tegumentos de sementes como uma estrutura de defesa química e não exclusivamente física foi realizado por Janzen (1977). Nesse trabalho foi mostrado que a maioria (mais de 69 %) dos tegumentos das 73 espécies de sementes usadas no estudo foram importantes em prevenir a penetração das larvas do inseto *Callosobruchus maculatus*. Para um grande número de espécies essa interferência não pode ser relacionada às características de rigidez ou espessura do tegumento, sugerindo a participação de substâncias bioativas nesses tecidos (Janzen, 1977).

A infestação de sementes de *Phaseolus lunatus* por larvas de *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae) foi também influenciada pelo tegumento (Thiery, 1984) e a sobrevivência larval sobre o tegumento foi dependente diretamente da habilidade de larvas do primeiro instar de penetrar esse tecido (Thiery et al., 1994). Em outro trabalho foi mostrado que apenas 50% das larvas de *Callosobruchus chinensis* e *C. maculatus* foram incapazes de perfurar o tegumento de sementes de *Vicia faba* (Desroches et al., 1995). Apesar desses e outros trabalhos terem mostrado a interferência dos tegumentos na infestação das sementes por larvas de bruquídeos, os efeitos desses tecidos sobre a morfologia e a bioquímica das larvas permanecem desconhecidos. O conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na toxicidade de compostos dos tegumentos para bruquídeos pode auxiliar na elaboração futura de estratégias eficientes para a geração de sementes menos susceptíveis ao ataque de insetos. O reforço dos mecanismos de defesa química dos tegumentos pode representar uma barreira mais eficiente de proteção, pois a toxicidade seria antecipada para estruturas mais externas das

sementes, minimizando a entrada do agressor e conseqüentemente os danos ao embrião e tecidos de reserva.

Esse trabalho teve como objetivo principal avaliar a interferência do tegumento de *Phaseolus vulgaris* em eventos do ciclo de vida do inseto *Callosobruchus maculatus*, tais como oviposição, embriogênese, desenvolvimento e sobrevivência larval.

A avaliação do efeito desse tecido sobre o desenvolvimento embrionário mostrou que os embriões de *C. maculatus* se desenvolveram de maneira similar, independente se sobre o tegumento de *V. unguiculata* ou *P. vulgaris*. Nas primeiras 24 HAO, o desenvolvimento embrionário finalizava o estágio de blastoderma celular e se encontrava na metade da extensão da banda germinal que se encerra no período de 24-28 HAO. Nesse período iniciava-se a retração da banda germinal que perdurou até 60-64 HAO. Ainda nesse período ocorreu o aparecimento dos segmentos corporais e apêndices das patas, seguido do fechamento dorsal entre 60-88 HAO, onde os segmentos se tornaram mais evidentes. O processo embrionário foi concluído em aproximadamente 5 dias após a oviposição (DAO). Esses resultados mostraram que a toxicidade do tegumento de *P. vulgaris* para *C. maculatus* não está relacionada a interferências no processo de embrionário do inseto.

Embora o processo de embriogênese de *C. maculatus* não tenha sido previamente descrito, um trabalho anterior realizado pelo nosso grupo já havia mostrado o comportamento de ovos de *C. maculatus* sobre tegumentos de sementes hospedeiras e não hospedeiras (Souza et al., 2011). Nesse trabalho foi observado que as larvas de *C. maculatus* estavam aparentemente formadas dentro do ovo 5 DAO, ocorrendo a eclosão larval e a penetração total de tegumentos de sementes hospedeiras até 6 DAO (Souza et al., 2011). Já o comportamento dos ovos postos sobre os tegumentos de sementes não hospedeiras, principalmente *Canavalia ensiformis* apresentava algumas alterações. Muitos desses ovos murchavam em 2 DAO, indicando que alguns tegumentos podem interferir na aderência dos ovos. Nos ovos que permaneciam aderidos ao tegumento de *C. ensiformis* a embriogênese

aparentemente ocorria normalmente, entretanto as larvas eram incapazes de eclodir, permanecendo vivas dentro dos ovos até no máximo 17 DAO (Souza et al., 2011). Esses resultados embora preliminares, já apontavam que o efeito não se relacionava a atrasos na embriogênese do inseto (Souza et al., 2011).

Nos experimentos com sementes artificiais cobertas com tegumentos naturais foi observado que o tegumento de *P. vulgaris* influenciou em vários aspectos do ciclo de vida normal do inseto, causando uma diminuição de aproximadamente 50% na taxa de oviposição, aumentando em quase o dobro o tempo necessário para a larva atravessar o tegumento e reduções de 40% na sobrevivência larval e de até 65 % na massa das larvas.

Trabalhos realizados pelo nosso grupo na última década já apontavam para os efeitos de farinhas e frações proteicas de tegumentos em larvas de *C. maculatus*, principalmente reduzindo a massa e o número de sobreviventes (Oliveira et al., 1999; Oliveira et al., 2009; Souza et al., 2011; Souza et al., 2012).

Nosso grupo também já mostrou que o tempo de travessia pelo tegumento de sete cultivares de soja (*Glycine max*) por larvas de *C. maculatus* foi drasticamente aumentado em relação ao tegumento controle (Souza et al., 2011). A farinha desses tegumentos também se mostrou extremamente tóxica para as larvas. Devido a todos os trabalhos que mostram toxicidade dessas farinhas ou compostos isolados de tegumentos para as larvas de *C. maculatus* (Oliveira et al., 1999; Moraes et al 2000; Silva et al., 2004; Oliveira et al., 2004; Oliveira et al., 2009; Souza et al., 2011; Souza et al., 2012) a presença de substâncias bioativas nesses tecidos é inquestionável.

Os resultados obtidos nesse trabalho quando sementes artificiais foram confeccionadas contendo tegumento artificial composto por concentrações diferentes de farinha de tegumento de *P. vulgaris* mostraram interferência similar ao tegumento natural (íntegro) com diminuição do número de ovos postos, aumento do tempo para travessia e redução na massa larval. Os efeitos tóxicos observados foram dose-dependente. Esses resultados indicam a presença de substâncias tóxicas nos tegumentos de *P. vulgaris* e mostram que

a interferência no desenvolvimento larval não estava relacionada apenas às características físicas do tecido.

A atividade das principais enzimas digestivas das larvas de 15 e 20 DAO que se desenvolveram em sementes cobertas com tegumentos naturais de *V. unguiculata* ou *P. vulgaris* foram analisadas e observações reduções que variaram de 20% a mais de 55% nas atividades de proteases cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glucosidases foram constantes. Entre 15 e 20 DAO houve um aumento expressivo na atividade das enzimas digestivas, principalmente proteases cisteínicas e  $\alpha$ -amilases, indicando um pico digestivo próximo a 20 DAO. Esse aumento no potencial digestivo das larvas pode explicar o menor efeito inibitório observado pelo tegumento de *P. vulgaris* em larvas de 20 DAO.

Trabalhos prévios já mostravam que as enzimas proteases cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glucosidases são críticas para a digestão do inseto *C. maculatus*. Pedra e colaboradores identificaram, através de análises transcriptômicas, em torno de 20 genes que codificam para enzimas potencialmente envolvidas na digestão de alimentos em *C. maculatus*, incluindo proteases cisteínicas e aspárticas e amilases (Pedra et al., 2003). Também através de análises transcriptômicas de intestinos foi demonstrado que a transcrição de genes relacionados aos processos digestivos de larvas de *C. maculatus* variou em resposta a trocas alimentares. A transcrição de genes que codificam proteases do tipo cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -glicosidases foi inibida em larvas de terceiro instar ( $\pm$  15 dias de desenvolvimento) após uma alimentação artificial contendo cistatina de soja (inibidor de proteases cisteínicas). Esses mesmos genes, quando em larvas de quarto instar ( $\pm$  20 dias de desenvolvimento) têm sua transcrição aumentada sob a mesma alimentação (Chi et al., 2009). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que enquanto a transcrição de determinados grupos de genes com diferentes funções biológicas foi inibida, a de outros foi estimulada. Os autores sugerem que as larvas reorganizam seus recursos genômicos para minimizar o impacto do inibidor na dieta (Chi et al., 2009).

Em um recente trabalho, foi feita a análise proteômica intestinal de larvas de *C. maculatus* que tiveram uma alimentação artificial contendo

também uma cistatina de soja. Enzimas relacionadas à digestão como amilases, proteases tipo cisteínica e glicosidases tiveram sua tradução reduzida após a alimentação com o inibidor. O número de proteínas identificadas que são associadas com transcrição/tradução e reações anti-estresse que responderam à alimentação com cistatina, implica em um substancial rearranjo proteômico em larvas de *C. maculatus* expostas ao inibidor (Nogueira et al., 2012).

Larvas com 15 e 20 dias após a oviposição que se desenvolveram no interior de sementes artificiais cobertas com 10% de farinha de tegumento de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* (marcados com FITC) foram dissecadas e seus intestinos analisados por microscopia de fluorescência. Uma forte fluorescência foi observada em intestinos de larvas que ingeriram o tegumento artificial de *P. vulgaris* enquanto um fraco sinal de fluorescência foi observado nas fezes. O oposto foi observado para as larvas que atravessaram o tegumento artificial de *V. unguiculata*. As observações de uma alta fluorescência no intestino associadas com a baixa fluorescência encontrada nas fezes sugerem que as proteínas presentes no tegumento de *P. vulgaris* estão retidas no intestino larval. Uma justificativa para este resultado é a ligação de possíveis proteínas do tegumento de *P. vulgaris*, com propriedades de ligação à quitina, ao gel peritrófico das larvas do inseto *C. maculatus*. Essa justificativa vai de encontro ao fato de que já foram purificadas proteínas ligadoras de quitina no tegumento de *Albizia lebbbeck* (Souza et al., 2012).

## 6- CONCLUSÕES

- ✓ O desenvolvimento embrionário do inseto *Callosobruchus maculatus* ocorreu de forma similar sobre o tegumento da semente hospedeira *V. unguiculata* e da semente não hospedeira (*P. vulgaris*);
- ✓ O tegumento natural de *Phaseolus vulgaris* interferiu no desenvolvimento pós-embrionário do inseto *Callosobruchus maculatus*, diminuindo a oviposição da fêmea, aumentando o tempo para a completa travessia da larva pelo tegumento, diminuindo a eclosão, a sobrevivência e a massa das larvas;
- ✓ Larvas de *Callosobruchus maculatus* com 15 e 20 DAO que atravessaram o tegumento natural de *Phaseolus vulgaris* tiveram uma considerável redução na atividade de enzimas digestivas como: proteases cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glucosidases;
- ✓ Tegumentos artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de tegumento de *Phaseolus vulgaris* interferiram de maneira dose-dependente na oviposição da fêmea, tempo de travessia pelo tegumento, eclosão, sobrevivência e massas das larvas do inseto *Callosobruchus maculatus*;
- ✓ Proteínas dos tegumentos de *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* foram ingeridas e ainda estavam presentes no trato intestinal de larvas de 15 e 20 DAO. Esse material também apareceu nas fezes das larvas durante esse período. Os dados indicam uma maior quantidade dessas proteínas no trato intestinal e uma menor quantidade excretada nas fezes das larvas que atravessaram os tegumentos artificiais contendo tegumento de *P. vulgaris*.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, E., Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S. (2005). Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 57: 189–202.
- Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1154: 237-282.
- Bastos, J. A. M. (1981). Principais pragas de cultivares e seus controles. Nobel: 50-84.
- Bewley, J. D. & Black, M. (1994). In: *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2<sup>o</sup> ed. New York: Pl. Press, 1994. p. 40-50.
- Bewley, J.D. (1997). Breaking down the walls - a role for endo- $\beta$ -mannanase in release from seed dormancy? *Trends in Plant Science* 2(12): 464-464.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry* 72: 248-254.
- Broekgaarden, C., Snoeren, T.A.L., Dicke, M., Vosman, B. (2011). Exploiting natural variation to identify insect-resistance. *Genes Plant Biotechnology Journal* 9: 819–825.
- Brusca, R.C & Brusca, G.J. (2007). *Invertebrados*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2<sup>a</sup> ed. 968p.
- Carlini, C.R. & Grossi-D-Sá, M.F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515-1539.
- Carlini, C.R., Ferreira-Da Silva, C.T., Gombarovits, M.E.C. (2000). Processo de Produção de Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina. Patente PI0003334-0, DEINPI/RS, Brasil, 6 de junho de 2006.

- Castro, MS & Fontes W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters* 12(1):13-8.
- Chapman, R.F. (1998). *The Insects Structure and Function*. Cambridge. 325-359 p.
- Chi, Y.H., Salzman, R.A., Balfe, S., Ahn, J.E., Sun, W., Moon, J., Yun, D.J., Lee, S.Y., Higgins, T.J.V., Pittendrigh, B., Murdock, L.L., Zhu-Salzman, K. (2009). Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin – costs and benefits of counter-defence. *Insect Molecular Biology* 18 (1), 97–110.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R. (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science* 11: 302–308.
- Cloutier, C., Jean, C., Fournier, M., Yelle, S., Michaud, D. (2000). Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44: 69-81
- Cohen, E. (1993). Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 22: 245–261.
- Conceição, J. (2008). Quitinases do tegumento de soja *Glycine max*. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Licenciatura em Biologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Copeland, L. O. (1980). In: *Principles of seed science and technology*. Burgess Publishing Company. 5: 756.
- Costa, C. (1999). Coleoptera Linnaeus, 1758. In: *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil*. Joly, C.A. and C.E.M. Bicudo (orgs.). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, SP.
- Credland, P. F. & Dendy, J. (1992). Intraespecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 65: 39-47.

- Desroches, P., El Shazly, E., Mandon, N., Duc, G., Huignard, J. (1995). Development of *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in seeds of *Vicia faba* L. differing in their tannin, vicine and convicine contents. *Journal of Stored Products Research* 31: 83 – 89.
- Dillon, R.J., Ivens, A.C., Churcher, C., Holroyd, N., Quail, M.A., Rogers, M.E., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Lehane, M.J., Bates, P.A., (2006). Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect–parasite relationship. *BMC Genomics* 88: 831–840.
- Erthal, Jr. M., Silva C.P., Samuels R.I. (2004). Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *Journal of Insect Physiology* 50: 881–89.
- Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G., (1997). Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 15: 137–141.
- Foe, V.E. & Alberts, B.M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science* 61: 31-70.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., G.C.;Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. (2002). *Manual de Entomologia Agrícola*. Piracicaba, Feealq, 920p.
- Gatehouse, A.M.R., Butler, K., Fenton, K.A., Gatehouse, J.A. (1985). Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 39: 279–286.
- Gilbert, F.S. & Raunio, M.A. (1997). *Embryology Constructing the Organism*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers.

- Gilbert, S. F. (2006). *Developmental Biology*. Sinauer Associates. Inc., Sunderland.
- Gilbert, S.F. & Raunio A.M. (1997). *Embryology, Constructing the Organism* Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA
- Gillott, G. (2005). *Entomology*: Springer. 597-622 p.
- Giorgi, F. & Nordin, J.H. (1994). Structure of yolk granules in oocytes and eggs *Blattella germanica* and their interaction with vitellophages and endosymbiotic bacteria during granule degradation. *Journal of insect Physiology* 40: 1077-1092.
- Goates, B.S., Sumerford, D.V., Hellmich, R.L., Lewis, L.C. (2008). Mining an *Ostrinia nubilalis* midgut expressed sequence tag (EST) library for candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Insect Molecular Biology* 17 (6), 607–620.
- Grossi de-Sá, M.F. & Chrispeels, M.J. (1997). Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzymes with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 271–281.
- Gullan, P.J. & Cranston, P.S. (2000). *Insects: An Outline of Entomology*, 2nd edition. Blackwell Science, 502 pp.
- Haq, S.K.; Atif S.M.; Khan, R.H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431: 145-159.
- Herget, T., Schell, J., Schreier, P.H., (1990). Elicitor-specific induction of one member of the chitinase gene family in *Arachis hypogaea*. *Molecular Genetics and Genomics* 224: 469–476.
- Janzen, D. H. (1977). How southern cowpea weevil larvae (*Callosobruchus maculatus*) die on non-host seeds. *Ecology*. 58: 921-927.
- Jochim, R.C., Teixeira, C.R., Laughinghouse, A., Mu, J., Oliveira, F., Gomes, R.B., Elnaïem, D.-E., Valenzuela, J.G., (2008). The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from

- sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum* chagasi-infested sand flies. BMC Genomics 9: 15-22.
- Kaplan, I., Dively, G.P., Denno, R.F. (2009). The costs of anti-herbivore defense traits in agricultural crop plants: a case study involving leafhoppers and trichomes. Journal of Applied Ecology. 19: 864–872
- Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (1985). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology (Edited by:). New York: Pergamon Press 37–84.
- Khajuria, C., Zhu, Y.-C., Chen, M.-S., Buschman, L.L., Higgins, R.A., Yao, J., Muthukrishnan, S., Zhu, K.Y. (2009). Expressed sequence tags from the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larval gut: identification of the genes potentially involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity and resistance. BMC Genomics 10: 286-295.
- Kitch, L.W. & Murdock, L.L. (1986). Partial characterization of a major gut thiol proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* F. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 3: 561–575.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1997). Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. Trends in Plant Science. 2: 379–384.
- Kozlowski, T. T. (1972). In: Seed Biology. V.II. 2<sup>nd</sup>. Ed. Wiley N. York. 4-114.
- Lawrence, J.F. & Britton, E.B. (1991). Coleoptera. In: CSIRO ed. The Insects of Australia. 2 ed. Victoria, Melbourne University, volume 2, 543-683.
- Lawrence, P. K. & Koundal, K. R. (2002) Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Electronic Journal of Biotechnology, 5(1): 93-109.
- Lemos, F.J.A., Campos, F.A.P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J. (1990). Proteases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. Entomologia Experimentalis Et Applicata 56: 219–227.
- Macedo, M.L.R., Andrade, L.B.S., Moraes, R.A., Xavier-Filho, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the

- cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 105: 89–94.
- Mazumdar-Leighton, S., Broadway, R.M. (2001). Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 645–657
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Bernier-Vadnais, N., Faye, L., Yelle, S. (1994). Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. *Plant Physiology* 90: 497-503.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Moise, A. J., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, A. D. Mikic, A. L. B.(2005). Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41(41): 620-644.
- Moraes, R., Sales M.P., Pinto, M.S.P., Silva, L.B., Oliveira, A.E.A., et al. (2000). Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 191-198.
- Murdock, L.L., Brookhart, G., Dunn, P.E., Foard, D.E., Kelley, S. (1987). Cysteine digestive proteases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87: 783-787.
- Nation, J.L. (2002). Digestion. In: Nation, J.L. (Ed.), *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 27–64.
- Neurath, H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350-357.
- Nogueira, F.C.S., Silva, C.P., Alexandre, D., Samuels, R. I., Soares, E. L., Aragão, F. J. L., Palmisano, G., Domont, G.B., Roepstorff, P., Campos, F. A. P. (2012). Global proteome changes in larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae:Bruchinae) following ingestion of a cysteine proteinase inhibitor. *Proteomics* 00: 1–12.

- Oliveira, A. E. A. ; Sasaki, G. L ; Iacomini, M. ; Cunha, M. da ; Fernandes, K. V. S. (2001). Isolation and characterization of a galactorhamnan polysaccharide from the seed coat of *Canavalia ensiformis* that is toxic to the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*.. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101: 225-231.
- Oliveira, A. E. A.; Fernandes, K.V.S.; Souza, A. J. ; Santos, P.O. (2009). Influence of the soybean seed coat upon seed infestation and development of *Callosobruchus maculatus* larvae. In: Soybean and Wheat Crops: Growth, Fertilization, and Yield: Soybean crops: growth, fertilization and yield. New York: Nova Science Publishers 335-372.
- Oliveira, A.E.A., Ribeiro, E.S., Cunha, M., Gomes, V.M., Fernandes, K.V.S., et al. (2004). Insulin accelerates seedling growth of *Canavalia ensiformis* (Jack bean). *Plant Growth Regulation* 43: 57-62.
- Oliveira, A.E.A., Sales, M.P., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (1999). The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92: 249-255.
- Osborn, T.C., Alexander, D.C., Sun, S.S.M., Cardona, C., Bliss, F.A. (1988). Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science* 240: 207–210.
- Pedra, J.H.F., Brandt, A., Westerman, R., Lobo, N., Li, H.M., Romero-Severson, J., Murdock, L.L., Pittendrigh, B.R. (2003). Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteases and  $\alpha$ -amylases associated with food breakdown. *Insect Molecular Biology* 12 (4): 405–412.
- Pereira, P.R.V.S. & Almeida, L.M. (2001). Chaves para identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. *Revista Brasileira de Zoologia* 18(1): 271-283.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. (1995). Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109: 347–352.

- Quintela, E. D., Neves, B. P. das, Quinderé, M. A. W., Roberts, D. W. (1991). Principais pragas Del caupi em el Brasil. Goiânia: Embrapa-Cnpaf. (Embrapa-Cnpaf. Documentos, 35).
- Ramalho-Ortigao, M., Jochim, R.C., Anderson, J.M., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., (2007). Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, bloodfed and *Leishmania* major-infected sandflies. BMC Genomics 8: 300-312.
- Ramsey, J.S., Wilson, A.C., de Vos, M., Sun, Q., Tamborindeguy, C., Winfield, A., Malloch, G., Smith, D.M., Fenton, B., Gray, S.M., Jander, G. (2007). Genomic resources for *Myzus persicae*: EST sequencing, SNP identification, and microarray design. BMC Genomics 8: 423-430.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62:597–635.
- Sabater-Munoz, B., Legeai, F., Rispe, C., Bonhomme, J., Dearden, P., Dossat, C., Duclert, A., Gauthier, J.P., Ducray, D.G., Hunter, W., Dang, P., Kambhampati, S., Martinez-Torres, D., Cortes, T., Moya, A., Nakabachi, A., Philippe, C., Prunier- Leterme, N., Rahbe, Y., Simon, J.C., Stern, D.L., Wincker, P., Tagu, D. (2006). Largescale gene discovery in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera). Genome Biology 7 (3), R21.
- Sales, M.P., Gerhardt, I.R., Grossi-de-Sa, M.F., Xavier-Filho, J. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Plant Physiology 124: 515–522.
- Santos, J.H.R., Teofilo, E.M., Almeida, J.M., Oliveira, F.J. (1977). Percentagens de sementes de cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi, atacada pelo *Chalcodermus bimaculatus* Fieldler, 1936 (Col: Curc). Em Ceará. UFC. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Fitotecnia, Fortaleza. 70-74.
- Santos, P.O., Santos, I.S. , Gomes, V.M ., Machado,O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., Oliveira, A.E.A. (2008). In vitro evaluation of antifungal

- activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. *Journal of Stored Products Research*. 44: 310-315.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*. New York: Oxford University Press.
- Schuman, M.C., Heinzl, N., Gaquerel, E., Svatos, A., Baldwin, I.T. (2009) Polymorphism in jasmonate signaling partially accounts for the variety of volatiles produced by *Nicotiana attenuata* plants in a native population. *New Phytologist* 183: 1134–1148.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgins, T.J.V., Chrispeels, M.J. (1994) Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Biotechnology* 12: 793–796
- Silva, C.P. & Xavier-Filho, J. (1991) Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 99: 529–533.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Sa, M.F.G., Lopes, A.R. Pontes, E.G. (1999) Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 355–366.
- Silva, L. B., Sales, M. P., Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (2001). The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 76 (1): 57-65.
- Silva, L.B., Sales, M.P., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., et al. (2004). The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera:Bruchidea)]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 76: 57-65.

- Simpson, R.M., Newcomb, R.D., Gatehouse, H.S., Crowhurst, R.N., Chagne, D., Gatehouse, L.N., Markwick, N.P., Beuning, L.L., Murray, C., Marshall, S.D., Yauk, Y.-K., Nain, B., Wang, Y.-Y., Gleave, A.P., Christeller, J.T. (2007). Expressed sequence tags from the midgut of *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Molecular Biology* 16 (6): 675–690.
- Snoeren, T.A.L., Kappers, I.F., Broekgaarden, C., Mumm, R., Dicke, M. and Bouwmeester, H.J. (2010) Natural variation in herbivore-induced volatiles in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 61: 3041–3056.
- Southgate, B. J. (1979). Biology of the Bruchidae. *Annual Reviews of Entomology* 24 (1): 449-473.
- Souza, A.J., Santos, P.O., Pinto, M.S.T., Wermelinger, T.T., Ribeiro, E.S., et al. (2011). Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Crop Protection* 30:651-657
- Souza, AJ., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Beghini, D.G., Fernandes, K.V.S., et al. (2012) Identification of *Albizia lebbek* seed coat chitin-binding vicilins (7S globulins) with high toxicity to the larvae of the bruchid *Callosobruchus maculatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45: 118-124.
- Terra, W. R. (2001) The Origin and Functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47:47–61.
- Terra, W.R & Ferreira,C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function (Review). *Comparative Biochemistry and Physiology* 109: 1962.
- Terra, W.R (1990). Evolution of digestive system of insects. *Annual Review of Entomology* 35: 181-200.
- Terra, W.R., Ferreira, C., De Bianchi, A.G. (1979). Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells

of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology* 25:423 – 434

- Thiery D, Jarry M, Pouzat J (1994) To penetrate or not to penetrate? A behavioral choice by bean beetle first-instar larvae in response to *Phaseolus vulgaris* seed surface quality. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1867–1875.
- Thiery, D. (1984). Hardness of some fabaceous seed coats in relation to larval penetration by *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 20: 177-181.
- Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:253-279.
- Whiting, M. F. (2002). Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. *Zoologica Scripta* 31 (1): 3–15.
- Wigglesworth, V. B. 1972. *The Principles of Insect Physiology*, 7th Edition. Chapman & Hall, London.
- Williams, J. O. (1980). Note on bruchidae associated with stored products in Nigeria. *Tropical Grain Legume Bulletin*. 26: 5-10.
- Wolpert, L. (2007) *Principles of Development*. Oxford University Press, Oxford.
- Wu, J., Hettenhausen, C., Schuman, M.C., Baldwin, I.T. (2008) A comparison of two *Nicotiana attenuata* accessions reveals large differences in signaling induced by oral secretions of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Plant Physiology*. 146, 927–939.
- Xavier-Filho, J. (1993). Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimento. Organização dos Estados Americanos (OEA). 1ª. Edição, Editora Universitária – UFC.
- Yousef, M.I., F.M. El-Demerdash, K.I. Kamel and K.S. Al-Salhen (2003). Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. *Toxicology*, 189: 223-234.
- Yuki, M., Moriya, S., Inoue, T., Kudo, T. (2008). Transcriptome analysis of the digestive organs of *Hodotermopsis sjostedti*, a lower termite that hosts

mutualistic microorganisms in its hindgut. *Zoological Science* 25 (4): 401–406

Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R.A., Shade, R.E., Ahn, J.E. (2003). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12: 135–145.