



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTAS UTILIZANDO O GENE
bv11, VISANDO RESISTÊNCIA A INSETOS**

ANNA LIA ARAÚJO SANT'ANNA

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



Universidade Federal de Pelotas

Campus Universitário
Caixa-postal 354 CEP 96010-900
Pelotas – RS – Brasil.

ANNA LIA ARAÚJO SANT'ANNA

**CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO DE PLANTAS UTILIZANDO O
GENE *bvI*, VISANDO RESISTÊNCIA A INSETOS**

Monografia apresentada como um dos requisitos ao grau de Bacharel em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

Prof. MSc. Luciano da Silva Pinto - Orientador
Centro de Biotecnologia, UFPel

Pelotas
Estado do Rio Grande do Sul – Brasil
2007

Banca examinadora:

Prof. MSc. Luciano Martins Pinto

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Dedico este trabalho aos meus amados pais
Wladmir e Roselaine, as minhas irmãs Janis e
Liége e ao meu querido Ro.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas.

Ao Professor Luciano da Silva Pinto, pela sua orientação, baseada na amizade, dedicação, paciência e confiança, agradeço-o por ser um verdadeiro mestre, servindo como exemplo de profissional e garantindo meu crescimento pessoal.

Aos meus pais por alicerçarem todas as minhas escolhas e estarem sempre presentes me dando o suporte e amor necessário; a toda minha família por acreditar e me incentivar a ser melhor a cada dia.

Ao meu querido companheiro Ronaldo, pela força e incentivo nas horas mais difíceis, apesar da nossa grande distância e saudades.

Aos meus colegas do Centro de Biotecnológico: Andréa, Marina, Michele, Natália, Roberta, Suselaine e também aos meus queridos colegas e amigos Alexandra, Aline, Karen, Inti, Michel e Tessália, pela amizade, auxílio e companheirismo, pelos momentos em que precisei de conselhos e ajuda na execução de minhas atividades.

A todos os meus amigos não citados, mas também importantes, por fazerem parte da minha vida.

Aos professores e a todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidos na minha formação.

E acima de tudo, a Deus, por me possibilitar a fé, a força e a esperança.

RESUMO

SANT'ANNA, Anna Lia. Universidade Federal de Pelotas. **Construção de um vetor de expressão em plantas utilizando o gene *bvl I*, visando resistência a insetos.**

2007. 42f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso).

Professor Orientador: MSc. Luciano da Silva Pinto. Universidade Federal de Pelotas.

As lectinas de plantas são proteínas com capacidade de reconhecer e ligar-se a glicoconjugados presentes na superfície externa de microrganismos ou expostos ao longo do trato intestinal de insetos predadores de plantas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi construir um vetor de expressão em plantas, utilizando o gene da lectina *bvl I* de *Bauhinia variegata* visando à transformação genética de alface, buscando a resistência a insetos. Para isso, sementes de *B. variegata* foram colocadas para germinar em meio MS e o DNA vegetal extraído de folhas recém expandidas pelo método da lise alcalina. O gene da lectina de *bvl I* foi amplificado por PCR e o produto de PCR ligado ao vetor pGA643 e sendo transformado em *E. coli* TOP 10 por eletroporação. As células transformadas foram selecionadas em meio LB semi-sólido contendo canamicina. O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi preparado usando "GFX micro plasmid purification Kit" e os clones foram analisados em relação à presença do gene *bvl I* por PCR e verificado em gel de agarose. Um total de seis colônias recombinantes foram identificadas. Estes plasmídeos foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por choque térmico e os clones recombinantes estocados a -70°C . Estas construções serão usadas para a transformação da planta de interesse a fim de verificar a expressão da lectina e seu efeito sobre insetos incidentes na cultura de alface.

Palavras-chave: *Bauhinia variegata*, Lectina, clonagem, expressão.

ABSTRACT

SANT'ANNA, Anna Lia. Universidade Federal de Pelotas. **Construction of a plant expression vector using the *bvl I* gene, aiming insects resistance.** 2007. 42f. Supervisor: Luciano da Silva Pinto. Universidade Federal de Pelotas.

Plant lectines are proteins with the ability of recognizing and connecting to gluco-conjugates present at the external surface of microorganisms or exposed along the gastrointestinal tract of plant predator insects. Therefore, the objective of this work was to build a plant expression vector, using the *Bauhinia variegata*'s *bvl I* lectine gene aiming the genetic transformation of lettuce, in order to obtain the insect resistance. For that, *B. variegata* seeds were put to germinate in MS media and the vegetal DNA was extracted from immediately expanded leaves by alkaline lyses method. The lectine's gene *bvl I* was amplified by PCR (polymerase chain reaction) and the PCR product was cloned at the pGA643 vector; the recombinant plasmid was then inserted in *E. coli* TOP10 by electroporation. The transformed cells were selected in semi-solid LB media containing kanamycin. The plasmidial DNA from selected colonies was prepared using the "GFX micro plasmid purification Kit" and the clones were analyzed concerning the presence of the *bvl I* gene by PCR and then verified on agarose gel. From all the transformed colonies, six presenting the *bvl I/pGA643* construction were identified. This plasmid was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by heat shock and the recombinant clones were stored in glycerol 10% at -70°C. As the gene insertion was confirmed in the PCR, it will be used for the transformation of the interest plant in order to verify lectine's expression and its effect over commonly occurring insects in lettuce cultures.

Key – words: Bauhinia variegata, Lectin, cloning, expression.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática de Superlectinas .	4
FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, dos produtos da amplificação do gene <i>bvl I</i> por PCR..	25
FIGURA 3. Detecção rápida de colônias com o plasmídeo pCR2.1/ <i>bvl I</i> com fenol:clorofórmio.....	26
FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com os produtos da extração do plasmídeo pCR2.1/ <i>bvl</i>	26
FIGURA 5. Seqüência nucleotídica e de aminoácidos deduzidos do clone de cDNA da BVL.....	27
FIGURA 6. Representação esquemática da estrutura da lectina BVL e suas respectivas regiões.....	28
FIGURA 7. PCR do gene <i>bvl I</i> a partir do vetor pCR 2.1/ <i>bvl I</i> utilizando os primers Bauplanta 1 e Bauplanta 2 com sítio de restrição para <i>Xba I</i>	28
FIGURA 8 Desenho esquemático do vetor pGA643/ <i>bvl I</i> gerado pelo software VectorNTI 8.0 (Informax).	29
FIGURA 9. Eletroforese da digestão do vetor pGA643 e do gene <i>bvl I</i> com a enzima de restrição <i>Xba I</i>	30
FIGURA 10. PCR de colônia de <i>E. coli</i> TOP 10 transformadas com a reação de ligação de <i>bvl I</i> e pGA643.	30
FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.....	31
FIGURA 12. Região de anelamento dos primers e estratégia de sequenciamento....	32
FIGURA 13. Confirmação dos clones recombinantes de <i>A. tumefaciens</i> pela técnica de PCR..	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns exemplos de proteínas recombinantes de interesse terapêutico e comercial, produzidas em diferentes espécies de plantas.	13
Tabela 2 - Alguns exemplos de trabalhos publicados, em que expressaram lectinas vegetais, em diversos sistemas heterólogos.	14
Tabela 3 - Programa utilizado para realização da reação de PCR.	18
Tabela 4 - Descrição de cada componente utilizado na reação de PCR.	18

LISTA DE ABREVIATURAS

CIP: Fosfatase intestinal bovina

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxinucleotídeos tri-fosfato

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

g/L: gramas por litro

h: hora

LB: caldo de Luria Bertani

kb: quilo bases

min: minutos

mL: mililitro

M: molar

mg: miligrama

mM: milimolar

ng: nanograma

pb: pares de bases

PCR: "*Polimerase Chain Reaction*" (reação em cadeia da polimerase)

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

s: segundo

TBE: tampão tris-borato-EDTA

SDS: dodecil sulfato de sódio

TE: Tris-EDTA

UV: luz ultravioleta

V: volts

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

°C: graus celcius

%: percentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Lectinas.....	1
1.2. Propriedades biológicas das lectinas.....	5
1.2.1. Atividade inseticida.....	6
1.3. Lectinas de plantas superiores.....	8
1.4. Lectinas de leguminosas.....	10
1.5. O Gênero <i>Bauhinia</i>	11
1.6. Produção de proteínas recombinantes em plantas.....	12
1.7. Expressão heteróloga de lectinas.....	14
1.8. Transformação genética de alface.....	15
1.9. Objetivos.....	16
1.9.1. Geral.....	16
1.9.2. Específicos.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Extração de DNA total das folhas.....	17
2.2. Obtenção e preparo do gene <i>bvl I</i>	17
2.2.1. Síntese dos <i>primers</i>	17
2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	17
2.3. Clonagem do gene <i>bvl I</i> em sistema TOPO TA.....	19
2.3.1. Ligação do gene <i>bvl I</i> no vetor pCR 2.1.....	19
2.3.2. Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	19
2.3.3. Transformação em <i>E. coli</i>	20
2.3.4. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	20
2.3.5. Seqüenciamento.....	21
2.4. Clonagem do gene <i>bvl I</i> no vetor pGA643.....	21
2.4.1. Amplificação do gene.....	21
2.4.2. Purificação dos produtos de PCR.....	22
2.5. Ligação do gene <i>bvl I</i> ao vetor pGA643.....	22
2.5.1. Digestão do vetor pGA643 e do gene <i>bvl I</i>	22
2.5.2. Tratamento do DNA plasmidial (pGA643) com fosfatase alcalina.....	23
2.5.3. Inserção do gene <i>bvl I</i> no vetor pGA643.....	23
2.6. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404.....	23
2.6.1. Preparação de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	23
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Obtenção e preparação do gene <i>bvl I</i>	25
3.1.1. Amplificação do gene <i>bvl I</i>	25
3.2. Clonagem do gene <i>bvl I</i> sistema TOPO TA.....	26
3.3. Seqüenciamento dos clones selecionado.....	27
3.4. Clonagem do gene <i>bvl I</i> em vetor de expressão em planta.....	28
3.4.1. Amplificação do gene <i>bvl I</i> para clonagem em pGA643.....	28
3.4.2. Construção do plasmídeo pGA643/ <i>bvl I</i>	28
3.4.3. Ligação do vetor pGA643 ao gene <i>bvl I</i>	30
3.4.5. Confirmação da orientação do gene no vetor pGA643.....	31
3.5. Transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que têm especificidade por resíduos terminais ou subterminais de carboidratos. A principal característica desta classe de proteínas é sua habilidade de interagir com carboidratos e desta forma combinar-se com glicocomponentes presentes na superfície de células e tecidos provenientes desde plantas e animais, até bactérias e vírus (GUZMÁN-PARTIDA *et al*, 2004).

O termo hemaglutinina foi pela primeira vez utilizado em 1888 por Stillmark, ao observar que proteínas presentes em extratos de sementes de *Ricinus comunis* eram capazes de aglutinar eritrócitos. Posteriormente, devido ao fato das hemaglutininas serem encontradas principalmente em plantas superiores, elas passaram a ser chamadas de fitohemaglutininas.

Summer & Howell (1936) demonstraram que além da propriedade de aglutinar células tais como eritrócitos e leveduras, a *Canavalia eusiformis* Con A também precipitava glicogênio, além de sua aglutinação ser inibida por açúcares de cana, fornecendo indícios de que o evento de aglutinação dava-se em consequência de uma interação de dois ou mais sítios de ligação a carboidratos nessas proteínas. Esses sítios se combinam reversivelmente com glicolipídeos e glicoproteínas no lado externo da superfície celular, provocando uma ligação entre as células, e ocasionando a formação de uma malha que culmina com a aglutinação.

Ao observarem que muitas aglutininas reagiam com certos tipos de células, por serem específicas à determinado tipo de açúcar que existiam na superfície da membrana plasmática destas células, Boyd & Shaplich (1954) propuseram que as fitohemaglutininas fossem chamadas de lectinas, do latim (*legere*- escolher).

Dependendo das hemaglutininas serem de origem animal, vegetal ou fúngica, Liener (1976) propôs que o nome "lectina" fosse usado para designar todas as proteínas que se ligam a açúcares, podendo, ainda, serem chamadas de zoolectinas,

fitohemaglutininas ou micolectinas, respectivamente. Esta definição, por ser muito ampla, foi criticada pelo Comitê de Nomenclatura da União de Bioquímica Internacional (DIXON, 1981).

Apesar da reação de precipitação entre lectinas e polissacarídeos ou glicoproteínas ser semelhante à ligação que ocorre entre antígenos - anticorpos, as lectinas têm origem não-imune e os anticorpos têm estruturas semelhantes. Diferentemente, as lectinas possuem uma diversidade muito grande de composição de aminoácidos, número de subunidades, peso molecular e estrutura tridimensional (SHARON & LIS, 1989).

As definições citadas acima excluem algumas proteínas que apresentam homologia estrutural e capacidade de ligação a carboidratos semelhante às lectinas, mas que, por serem monovalentes, ou seja, possuem apenas um sítio de ligação para açúcares, não aglutinam células. Além disso, importantes descobertas de que lectinas podem conter um segundo tipo de sítio de ligação, o qual interage com um ligante não carboidrato e, que tanto a ligação lectina-carboidrato e lectina-ligante, são biologicamente significantes, levaram Barondes (1988) a redefinir o termo lectina como sendo proteínas de origem não enzimática ou antigênica, que se liga a carboidratos.

Não seria apropriado definir lectinas por sua atividade "*in vitro*", por não se conhecer o papel destas proteínas em organismos vivos (KOCOUREK & HOREJSI, 1981). Desta forma, os autores definiram lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de natureza não imune que se ligam a carboidratos, sem apresentar atividade enzimática contra esses açúcares e nem requerem grupos hidroxilas livres para sua ligação.

Combinando várias definições de lectinas, Sampaio (1997) propôs que lectinas são, em geral, proteínas de natureza não imune que se ligam e, ou precipitam carboidratos e glicoconjugados, exibindo uma atividade ligante reversível, não covalente a carboidratos e a substâncias que os contenham, livres em solução ou na superfície de células, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas.

Atualmente, a definição mais aceita e mais difundida no meio científico é aquela de Peumans & van Damme (1995), que definiram lectinas como sendo proteínas

vegetais que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se não covalentemente e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos.

Pela classificação de Peumans & van Damme (1995), com base na estrutura das lectinas, estas são divididas em três grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas possuem apenas uma cadeia polipeptídica e um único sítio de ligação a carboidratos, não sendo, assim, capazes de aglutinar eritrócitos. As hololectinas são semelhantes as merolectinas, mas ao contrário das primeiras, possuem dois ou mais sítios de ligação, sendo, desta forma, capazes de aglutinar células ou glicoconjugados. As quimerolectinas, além de possuir um sítio de ligação a carboidratos, estão providas de um outro domínio não relacionado, que apresenta atividade biológica distinta e independente (atividade enzimática, inativadora de ribossomos, etc). As quimerolectinas podem ou não apresentar atividade hemaglutinante, dependendo do número de sítios de ligação a açúcares.

Posteriormente, em 1998, estes mesmos autores criaram um novo grupo de lectinas, as superlectinas, que são constituídas por dois ou mais domínios carboidratos ligantes que, no entanto, se ligam a açúcares estruturalmente diferentes (Figura 1).

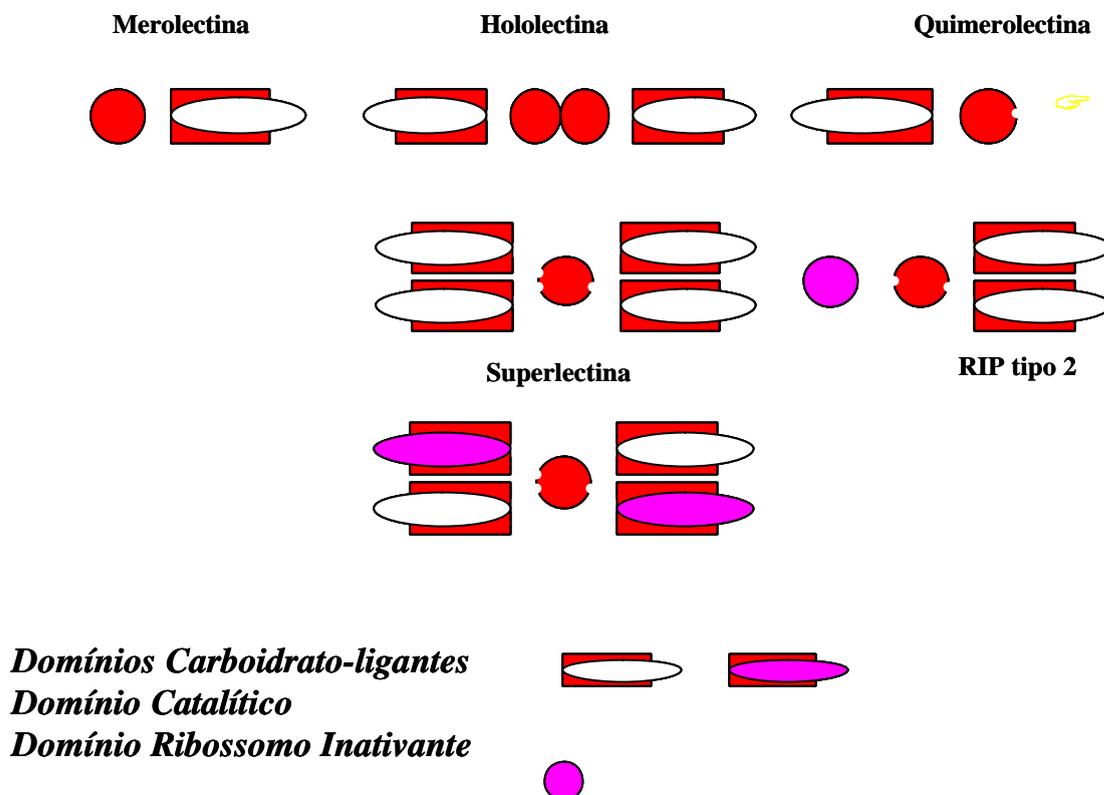


FIGURA 1. Representação esquemática de Mero, Holo, Quimero e Superlectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

As lectinas são comumente classificadas de acordo com sua especificidade por açúcares simples (monossacarídeos). Porém, além dos resíduos de aminoácidos que formam os sítios de ligação com monossacarídeos, outros resíduos próximos a este sítio, localizados na superfície da lectina, também participam na ligação com açúcares complexos ou glicoconjugados. Todos estes resíduos juntos formam um sítio estendido de ligação a carboidrato (RAMOS *et al.*, 2002), o que possibilita a ligação específica das lectinas com oligossacarídeos e glicoconjugados. Desta forma, a propriedade de ligação específica a carboidratos faz das lectinas notáveis marcadores utilizados em estudos histoquímicos, bioquímicos e em técnicas para caracterizar e diferenciar células cancerosas, por exemplo (SHERWANI *et al.*, 2003).

1.2. Propriedades biológicas das lectinas

As atividades biológicas das lectinas, especialmente de lectinas vegetais, estão sendo amplamente estudadas. Como exemplos tem-se a indução da produção de interferon- γ em ratos normais e infectados com *Leishmania* pela lectina ConBr de *Canavalia brasiliensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996); indução da produção de óxido nítrico (envolvido em efeitos anti-tumorais e anti-parasitários) por lectinas *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE *et al.*, 1999); atividade anti-inflamatória de lectinas de leguminosas (ASSREUY *et al.*, 1997); atividade inseticida (ZHU *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2003); mitogenicidade; inibição de crescimento de fungos, bactérias e parasitas, entre outras.

A característica mais importante das lectinas isoladas, tanto de origem animal como de origem vegetal, é a habilidade de ligar-se a açúcares e participar, assim, de vários eventos biológicos. A especificidade por açúcares simples ou oligossacarídeos mais complexos tem sido determinada com ensaios de inibição, acompanhado de cromatografia de afinidade (DEBRAY & ROUGÉ, 1984; DEBRAY *et al.*, 1994).

As lectinas diferem bastante em relação a sua especificidade por carboidratos. Algumas lectinas exibem especificidade anomérica, ligando-se preferencialmente com o anômero α ou β do monossacarídeo respectivo (SHARON & LIS, 1990). Muitas lectinas toleram variações na posição do C-2 do açúcar que se ligam, como por exemplo, lectinas que se ligam a manose, usualmente, interagem também com glicose e por vezes com Nacetilglicosamina. Substituições feitas no C-3 são aceitas por algumas lectinas e não por outras, sendo crítica a configuração relativa do grupo hidroxila do C-4, pois lectinas galactose-específica não interagem com glicose e nem lectinas glicose-específica interagem com galactose (SHARON & LIS, 1990).

Algumas lectinas interagem exclusivamente com oligossacarídeos, como aquelas específicas por oligossacarídeos de quitina: Leguminosae (*Griffonia simplicifolia* II, *Cystus sessifolius* e *Ulex europaeus*), Gramineae (*Hordeum vulgare*, *Secale cereale*), Solanaceae (*Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*) e lectinas que interagem com outros oligossacarídeos como Viceae (*Vicia graminea*), Sophoreae (*Maackia amurensis*), Phaseoleae (*Phaseolus vulgaris*) e Galogeeae (*Robinia pseudoacacia*) (SHARON & LIS, 1990).

Nas plantas, as lectinas podem estar envolvidas no processo de transporte de carboidratos, no alongamento da parede celular, em interações célula-célula, na regulação do crescimento, no reconhecimento de receptores de membrana, na auto-incompatibilidade ou em funções de estocagem (KILPATRICK *et al.*, 1986)

Devido às propriedades de interação específica com açúcares, essas proteínas têm sido usadas no isolamento e estudo de caracterização estrutural de oligossacarídeos, tipagem de grupos sanguíneos, tipagem de microrganismos, estimulação linfocitária, estudo e caracterização de glicoconjugados de superfície celular, estudo de processos inflamatórios, em estudos de sistema de liberação de drogas, etc. e, ainda, por apresentarem propriedades como imunossupressão, mitogenicidade e citotoxicidade são utilizadas na imunologia, na biologia celular e nos estudos sobre o câncer (ZENTENO & OCHOA, 1991).

Lectinas, também, podem ser utilizadas como marcadores moleculares para o estabelecimento de uma nova espécie, ou, ainda, esclarecer níveis de relacionamento entre táxons diferentes. Lectinas e isolectinas de leguminosas mostram-se interessantes marcadores filogenéticos, sugerindo que essas proteínas constituem boas ferramentas para a melhor definição de táxons a nível tribal (ROUGÉ *et al.*, 1987).

A lectina de *Canavalia brasiliensis* é considerada efetiva contra a infecção causada pela *Leshmania amazonensis* (Barral-Netto *et al.*, 1996). Por outro lado, lectinas de monocotiledôneas como as das famílias Liliaceae, Amarylliaceae, Orchidaceae, e Iridaceae mostraram-se mitogênicas (KILPATRICK, 1986).

Como lectinas distinguem tipos celulares, estas proteínas podem ser utilizadas como agentes para separação de células, podendo separar células normais de células malignas da medula óssea (KILPATRICK, 1986).

1.2.1. Atividade inseticida

As lectinas se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal, constituindo um mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de herbívoros, notadamente insetos (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995a, 1995b). O mecanismo de ação das lectinas inseticidas baseia-se na sua interação com receptores glicídicos presentes no intestino dos insetos. A ligação da lectina a esses

receptores promove uma desorganização da estrutura do epitélio digestivo, resultando numa menor absorção dos nutrientes presentes na dieta do inseto herbívoro. As lectinas também se ligam a várias enzimas digestivas, interferindo na sua atividade (FITCHES & GATEHOUSE, 1998). Desta maneira, as lectinas são consideradas como proteínas antinutricionais, pois causam uma interferência na digestão e absorção dos nutrientes, prejudicando o crescimento, desenvolvimento e reprodução (POWELL *et al.*, 1998).

Plantas transgênicas resistentes a pragas têm sido obtidas pela expressão de genes de lectinas vegetais (FOISSAC *et al.*, 2000; GATEHOUSE *et al.*, 1999; RAO *et al.*, 1998; TANG *et al.*, 1999).

A partir da biodiversidade da flora mundial, várias lectinas com diferentes especificidades de ligação a carboidratos e que produzem efeitos biológicos diversos têm sido identificadas, isoladas e caracterizadas. Dentre as lectinas estudadas, se destacam aquelas encontradas em leguminosas da subtribo Cercideae, notadamente as pertencentes aos gêneros *Bauhinia* e *Griffonia*, particularmente referentes às espécies *B. purpurea* e *G. simplicifolia*. As lectinas dessas plantas apresentam atividade inseticida para pragas agrícolas, como o *Callosobruchus maculatus*, uma praga de sementes armazenadas de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda). A lectina de *G. simplicifolia* apresenta atividade inseticida contra este afídeo *C. maculatus* (WU *et al.*, 1996). Um dos genes que codifica para lectinas nesta planta já foi clonado (WU *et al.*, 1996) e a proteína recombinante expressa em *Escherichia coli* atrasa o desenvolvimento de *C. maculatus* quando as larvas consomem uma dieta que contém a lectina II recombinante de *G. simplicifolia* (rGS-II). Além de exibirem atividade inseticida, as lectinas de Cercideae exibem uma série de atividades biológicas, tais como: aglutinação de células sanguíneas e mitogenicidade, inibição de crescimento de fungos e bactérias, transporte e armazenamento de carboidratos, efeito antitumoral e anticancerígeno.

Gatehouse *et al.* (1991) isolou uma lectina de sementes de *Psophocarpus tetragonolobus*, uma leguminosa encontrada em países tropicais, que se mostrou bastante tóxica para larvas de *C. maculatus*, com uma LC₅₀ de 3.5 mg/g em semente artificial. Em levantamento utilizando-se 26 lectinas, com especificidades para D-

glicose/D-manose, N-acetil-D-glicosamina e N-acetil-D-galactosamina/D-galactose, Czaplá e Lang (1990) identificaram 3 lectinas com atividade inseticida para larvas de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae). As lectinas foram avaliadas em bioensaios tópicos com o emprego de uma solução a 2% (20 mg/mL) de cada lectina. As lectinas significativamente efetivas foram as de mamona (*Ricinus communis*), a lectina do germe de trigo (WGA) e a de sementes de *Bauhinia purpurea*. As três lectinas produziram uma mortalidade de 100% no sétimo dia do bioensaio. Rahbé *et al.* (1995) realizaram um levantamento de atividade inseticida contra o afídeo da ervilha, *A. pisum*, utilizando 32 lectinas vegetais com diversas especificidades, incorporadas em dieta artificial numa faixa de concentração de 10 a 250 µg/mL. A atividade inseticida foi medida pela toxicidade (determinação de LC₅₀) e inibição do crescimento (LC₅₀) durante o período ninfal de *A. pisum*. As proteínas mais tóxicas foram a Con A, GNA, ACA (lectina de *Amaranthus caudatus*) e LcH (a lectina de lentilha, *Lens culinaris*), com valores de LC₅₀ variando de 68 a 312 µg/mL. Desta maneira, a utilização de genes que codificam lectinas para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos é uma estratégia bastante promissora.

1.3. Lectinas de plantas superiores

Embora exista um crescente interesse em lectinas animais, a maior parte das lectinas estudadas pertence ao grupo das plantas superiores, já tendo sido detectadas em aproximadamente duas mil espécies.

Apesar de mais de um século de estudos das lectinas, até o presente momento, não está completamente clara quais as suas funções nos organismos. Entre muitos papéis sugeridos, um bem aceito é que estas proteínas estariam envolvidas nos processos de defesa da planta, principalmente no que se refere à proteção dos tecidos vegetais contra o ataque de insetos, fungos, bactérias e outros predadores (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Uma função endógena atribuída as lectinas é a sua participação na simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas (SHARON & LIS, 1989 A; CHRISPEELS & RAIKEL, 1991). Neste caso, a ligação do microrganismo à raiz da planta ocorre pela interação direta entre carboidratos presentes na superfície da bactéria e a lectina presente nas raízes.

Em princípio, algumas funções endógenas poderiam ser atribuídas às lectinas de plantas, mas evidências sugerem que, a verdadeira função seja exógena. Isto se justifica por três fatores principais: primeiro, as lectinas são encontradas nas sementes em grandes quantidades; segundo, como proteínas de reserva, elas encontram-se isoladas do meio celular por estarem contidas em corpos protéicos e terceiro, a especificidade das lectinas não é propriamente para carboidratos vegetais, sendo que se observa maior afinidade por estruturas glicídicas não comuns às plantas.

As lectinas vegetais são, em geral, glicoproteínas que possuem alto peso molecular, sendo inibidas por monossacarídeos, requerendo cátions divalentes para a manutenção de sua atividade biológica e possuindo características estruturais semelhantes entre as famílias vegetais. Nos vegetais superiores, lectinas de duas famílias têm sido bastante estudadas: leguminosas e gramíneas, também conhecidas como lectinas que se ligam a quitina (CAVADA *et al.*, 1993).

Um novo grupo representado pelas lectinas de monocotiledôneas, principalmente de espécies das famílias Amaryllidaceae, Alliaceae, Araceae e Orchidaceae, que apresentam especificidade por D-manose e, diferentemente das lectinas encontradas nas leguminosas, não reconhecem D-glicose, sendo então conhecidas como lectinas manose-específicas (VAN DAMME *et al.*, 1995).

As sementes de muitas espécies da família Gramineae contêm lectinas que se ligam especificamente à N-acetilglicosamina (GlicNAc), seus oligômeros e quitina, um polímero de resíduos de GlicNAc. A maior parte destas lectinas isoladas possuem similaridades estruturais, sendo geralmente ricas em cisteína e glicina e possuindo um alto grau de homologia, principalmente com relação ao domínio da ligação à quitina. Isto sugere que elas provêm de um ancestral comum, onde os resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação a carboidratos, como no domínio da lectina de germe de trigo (WGA), são altamente conservados em todas as lectinas conhecidas como ligantes de quitina (CAVADA *et al.*, 1993).

1.4. Lectinas de leguminosas

A ordem Fabales é a que possui o maior número de lectinas isoladas, constituindo-se, assim, no maior e no mais bem caracterizado grupo de lectinas até o presente. Mais de uma centena de lectinas, distribuídas em diferentes famílias e tribos dessa ordem, já foram purificadas e caracterizadas. As lectinas de leguminosas compartilham muitas características estruturais semelhantes, tais como a seqüência de aminoácidos, a estrutura secundária e a conformação tridimensional, sugerindo que esta família de lectinas tenha evoluído a partir de um ancestral gênico comum.

A maioria das lectinas de leguminosas já isoladas são constituídas de uma unidade estrutural de 25 a 30 kDa que, via de regra, se associam formando dímeros ou tetrâmeros iguais ou diferentes entre si. Cada uma das subunidades possui um único sítio de ligação a carboidratos, com a mesma especificidade. Dentro da família Fabaceae, a subfamília Papilionoideae, tem sido a mais estudada, contendo lectinas de diferentes especificidade por açúcares (CAVADA *et al.*, 1993).

Algumas lectinas de leguminosas foram completamente seqüenciadas como: *Canavalia brasiliensis* (GRANGEIRO, 1996); *Dioclea grandiflora* (AINOUZ *et al.*, 1987; RICHARDSON *et al.*, 1984); *Canavalia gladiata* (YAMAUCHI *et al.*, 1989; YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1990); *Canavalia marítima* (PEREZ *et al.*, 1991); *Dioclea lehmanni* (PEREZ *et al.*, 1991).

A homologia entre lectinas de leguminosas é bem observada quando suas seqüências são dispostas circularmente. Essas lectinas são alinhadas a partir do resíduo 123 com a extremidade N-terminal de outras lectinas que possuem uma só cadeia polipeptídica; no caso das lectinas de duas cadeias polipeptídica (tribo *Viceae*), o resíduo 123 é alinhado com a extremidade N-terminal da cadeia ? e posteriormente o alinhamento é seguido pela cadeia ? (SHARON & LIS, 1990).

As similaridades observadas, sugerem que essas lectinas (de uma e de duas cadeias) são produtos de genes homólogos que divergiram durante a evolução. Esta homologia pode ainda ser fundamentada na observação de eventos pós-traducionais, que ocorrem durante a biossíntese da lectina de *Canavalia ensiformes* (Con A) (SHARON & LIS, 1990; CAVADA *et al.*, 1993; RAMOS, 1997).

1.5. O Gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* pertence a classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Fabales, Família Chaesalpinaceae, subfamília Papilionoideae e tribo Cercideae, possuindo mais de 500 espécie cosmopolitas, encontradas principalmente nos trópicos. As plantas variam desde arbustos, árvores pequenas de 5-9 metros de altura ou lianas. As folhas grandes, geralmente cartáceas são divididas fazendo com que se assemelhem a uma pata de vaca, característica do gênero. Produz flores brancas ou róseas, grandes e um legume de cor marrom (BURKART, 1952; SIMÕES, 1995).

No Brasil, o gênero é distribuído em todas as regiões, sendo principalmente encontrada *Bauhinia forficata*. O uso indígena de pata de vaca não é bem documentado, mas esta planta faz parte desde muito tempo como medicamento natural no Brasil.

Espécies deste gênero são descritas como hipoglicemiantes, depurativas, e diuréticas (ALMEIDA, 1993) e foram usadas durante mais de 60 anos para equilibrar níveis de açúcar no sangue em diabéticos. É considerada boa para "limpar" o sangue e uma decocção de folha é usada para tratar elefantíase (Almeida, 1993), bem como, também, outros problemas de pele que incluem os de natureza sifilítica (BERNARDES, 1984). Já foi chamada até mesmo " Insulina Vegetal " (CRUZ, 1995). Em outros países da América do Sul, também é extensamente utilizadas por diabéticos para ajudar a equilibrar os níveis de açúcar no sangue e outros sintomas produzidos por diabetes em nível do sistema urinário (HERBOPER, 1997).

Apesar do grande número de espécies do gênero *Bauhinia*, apenas *Bauhinia purpurea* teve isolada uma lectina (BPL) que apresenta massa molecular em torno de 30 kDa e não requer cátions divalentes para sua atividade, sendo inibida por lactose (KUSUI *et al.*, 1991, YAMAMOTO *et al.*, 1991, YOUNG *et al.*, 1985).

1.6. Produção de proteínas recombinantes em plantas

O uso de plantas para a produção de proteínas recombinante é uma das áreas em biotecnologia vegetal com maior apelo científico. Na tabela 1 estão representados alguns exemplos do uso de plantas para a produção de proteínas recombinantes.

Atualmente existem diversas estratégias para a produção de proteínas recombinantes em diferentes organismos vivos. Em plantas essa tecnologia não é absolutamente inovadora, porém vem se consolidando como uma das alternativas mais concretas aos métodos atuais, ocupará posição de destaque quando se intencionar a produção de proteínas complexas ou conjugados protéicos (GLYNIS GIDDINGS *et al.*, 2000), como as imunotoxinas, que são utilizadas no combate à células cancerosas. Além disso, muitas proteínas não podem ser produzidas em bactérias ou células de mamíferos por interferirem no crescimento, diferenciação e proliferação dessas. Diversos estudos comprovam a relevância de produção de proteínas monoméricas ou multiméricas em plantas mais facilmente que em bactérias, células de mamíferos ou animais transgênicos (RAINER FISCHER & NEIL EMANS, 2000).

Tabela 1 - Alguns exemplos de proteínas recombinantes de interesse terapêutico e comercial, produzidas em diferentes espécies de plantas.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES	ESPÉCIES DE PLANTAS
SUBSTÂNCIAS TERAPÊUTICAS HUMANAS	
? Hormônio do crescimento humano	? Tabaco, girassol e soja
? Albumina humana	? Tabaco e batata
? a-interferon	? Arroz
? Eritropoietina	? Tabaco
? Fosfatase alcalina humana	? Tabaco
? Apropitina	? Milho
? Colágeno	? Tabaco
? Fator IX	? Soja
ANTICORPOS RECOMBINANTES	
? Anticorpo scFv-anti-tn	? Soja
? Anticorpo scFv CD-18	? Soja
? Anticorpo IgG1	? Tabaco
? Anticorpo IgM	? Tabaco
? Anticorpo SIgA/G	? Tabaco
? Anticorpo LSC	? Alga
VACINAS RECOMBINANTES	
? Vírus da hepatite B	? Tabaco e alface
? Glicoproteína do vírus da raiva	? Tomate
? Vírus Norwalk	? Tabaco e batata
? Antígeno para diabetes	? Tabaco e batata
? Toxina B da cólera	? Tabaco e batata
? Doenças enterotoxigênicas	? Alface e batata
? Vírus da gastroenterite suína	? Tabaco e milho
OUTRAS	
? Proteínas da teia de aranha	? Soja, algodão e batata

1.7. Expressão heteróloga de lectinas

A expressão de lectinas vegetais em sistemas heterólogos oferece um meio de se produzir proteínas de seqüências definidas de aminoácidos, e permite que se faça uma relação entre seqüência e função em lectinas a serem exploradas através de mutações sítio-dirigidas. Entretanto, tentativas de expressar lectinas vegetais em bactérias e leveduras têm encontrado diversos resultados com sucessos alternados, e muito dependentes de cada caso (RAEMAEEKERS *et al.*, 1999).

Com isso, observa-se a importância da produção de lectinas vegetais a partir de sistemas heterólogos de expressão, em função da dificuldade de se obter essas proteínas diretamente das sementes, folhas ou demais partes da planta, uma vez que este processo inclui etapas laboriosas e onerosas de extração e purificação, além de não garantir rendimento e atividade da proteína. Algumas lectinas tem sido produzida em sistema heterólogos diferentes (Bactérias, leveduras e plantas) e um resumo dessas proteínas é demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Alguns exemplos de trabalhos publicados, em que expressaram lectinas vegetais, oriundas de diferentes plantas, em diversos sistemas heterólogos.

ORIGEM DAS LECTINAS	AUTOR	SISTEMA HETERÓLOGO
<i>Abrus pulchellus</i>	SANTOS, <i>et al.</i> 2002	<i>E. coli</i>
<i>Amaranthus caudatus</i>	WRIGHT, <i>et al.</i> 1997	<i>E. coli</i>
<i>Artocarpus integrifolia</i>	WRIGHT, <i>et al.</i> 1997	<i>E. coli</i>
<i>Bauhinia purpurea</i>	YAMAMOTO, <i>et al.</i> 2000	<i>E. coli</i>
<i>Canavalia ensiformis</i>	DINCTURK, <i>et al.</i> 2001	<i>E. coli</i>
<i>Cepaea hortensis</i>	GERLACH, <i>et al.</i> 2004	<i>E. coli</i>
<i>Ricinus communis</i>	GOTO, <i>et al.</i> 2003	<i>E. coli</i>
<i>Vicia villosa</i>	TAKEYA, <i>et al.</i> 1998	<i>E. coli</i>
Amaryllidaceae	BAUMGARTNER, <i>et al.</i> 2003	<i>Pichia pastoris</i>
<i>Aleuria aurantia</i>	AMANO, <i>et al.</i> 2003	<i>Pichia pastoris</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	TAGUE, <i>et al.</i> 1990	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Galanthus nivalis</i>	RAO, <i>et al.</i> 1998	<i>Oryza L.Sativa</i>
<i>Galanthus nivalis</i>	STOGER, <i>et al.</i> 1999	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Pisum sativum</i>	PATER, <i>et al.</i> 1993	<i>Nicotina tabacum</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	VOELKER, <i>et al.</i> 1987	<i>Nicotina tabacum</i>

1.8. Transformação genética de alface

A transformação genética de plantas tem sido empregada com os mais diversos objetivos. Embora a transformação de plantas seja rotina para muitas espécies vegetais ainda apresenta uma eficiência baixa para algumas espécies importantes (ARAGÃO 2002).

Plantas de alface (*Lactuca sativa*) podem ser utilizadas como modelo para a expressão heteróloga de proteínas pois é uma planta de crescimento rápido, florescimento e podem ser utilizadas como modelo para expressão de antígenos e demais transformações genéticas em folhas, uma vez que é uma planta consumida *in natura*. Além disso, o florescimento em condições de dia longo e produz muitas sementes por espiguetas. Sua aclimação é relativamente fácil e em poucos meses pode-se obter sementes R1 de eventos de transformação. Além disso, pode ser usada para avaliação testes de toxicidade ambiental (CURTIS *et al.* 1994; BOWERS *et al.* 1997; LOVATO *et al.* 1998).

Segundo Curtis (1994) a alface também apresenta como vantagem protocolos de regeneração estabelecidos e o fácil controle das etapas de desenvolvimento em casa de vegetação, evitando problemas com transmissão indesejada de genes para culturas isogênicas.

1.9. Objetivos

1.9.1. Geral

O presente projeto visa desenvolver um sistema de expressão para a lectina *bvl* I com atividade inseticida em plantas dando suporte, principalmente, a estudos estruturais, funcionais e de aplicações biotecnológicas, visando à transformação genética de alface e a resistência a insetos.

1.9.2. Específicos

- ? Isolar e seqüenciar o gene da lectina *bvl* I de *Bauhinia variegata*;
- ? Clonar o gene da lectina BVL em um vetor de expressão em planta;
- ? Analisar o vetor de expressão recombinante construído;
- ? Obter clones de *Agrobacterium tumefaciens* para aplicações futuras em experimentos de transformação genética de plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. Extração de DNA total das folhas

O DNA genômico foi isolado e purificado de 0,5 g de folhas jovens, obtidas através de cultura de tecidos. O protocolo para purificação foi baseado na utilização do reagente CTAB (cetyl triethylammonium bromide), como descrito por Foster & Twelli (1996). As proteínas foram removidas com clorofórmio: álcool isoamil (24:1) e as concentrações e qualidade do DNA nas amostras foram determinados pela razão entre as leituras de absorvância A260/A280 nm. A qualidade da preparação do DNA também foi verificada por eletroforese em um gel de agarose de 0,8 % (SAMBROOK & RUSSEL *et al.*, 2001).

2.2. Obtenção e preparo do gene *bvl I*

2.2.1. Síntese dos *primers*

A seqüência do gene *bvl I* de *Bauhinia variegata* foi amplificada utilizando-se os primers BAUL-F 5'(CATATGATGCTTCTCTACCAAC)^{3'} e BAUL-R 5'(GCATCCTTACATACTGGAATAA)³ (MWG-Biotech, USA). Estes iniciadores são complementares a seqüência de cDNA da lectina BPA de *B. purpurea* (Genbank número de acesso D12481).

2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Com a finalidade de amplificar o gene da lectina de *bvl I*, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As amostras foram submetidas ao programa descrito na Tabela 1, em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Tabela 3 - Programa utilizado para realização da reação de PCR.

Processo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	94° C	5 min	1
Desnaturação	94° C	1 min	35
Anelamento	45° C	40 Seg	35
Extensão	72° C	1 min	35
Extensão final	72° C	8 min	1

Os componentes da reação de PCR foram combinados como descrito na Tabela 2, com volume final de 25 µl. Como controle negativo foi realizada uma reação de PCR similar, porém os primers foram substituídos por água milli-Q.

Tabela 4 - Descrição de cada componente utilizado na reação de PCR.

COMPONENTES	Quantidade
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	0,2 µL
DNTP's (10 Mm)	1,0 µL
MgCl ₂	0,75 µL
Tampão de enzima 1X	2,5 µL
<i>Primers</i> (300 ng/µL)	0,5 µL de cada
DNA molde	0,5 µL
Água milli-Q	18,55 µL

Para confirmar a amplificação do DNA, 2 µl do produto de cada reação PCR com 2 µl de tampão de amostra 6x e o marcador de peso molecular *HindIII* foram aplicados em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo na concentração de 0,05 µg/mL. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (BioRad) com tampão TBE a 130 volts por 35 minutos. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultra-violeta.

2.3. Clonagem do gene *bvI* em sistema TOPO TA

2.3.1. Ligação do gene *bvI* no vetor pCR 2.1

O gene *bvI* foi inserido no vetor pCR 2.1 utilizando-se o sistema TOPO TA de clonagem (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A solução de clonagem foi preparada em um tubo de microcentrífuga com a capacidade para 1,5 mL, através da mistura de 2 µl do produto de PCR, 1 µl de solução salina apropriada, 1 µl do vetor TOPO e 2 µl de água estéril. Posteriormente, a reação ficou a temperatura ambiente por 15 minutos.

2.3.2. Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Para a realização deste procedimento, foram utilizadas células de *E. coli* cepa TOP 10 (Invitrogen) e foram preparadas para eletroporação utilizando o protocolo adaptado de Sambrook & Russel (2001), com algumas modificações. Uma alíquota da cultura de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen), presente na coleção de cepas do laboratório foi semeada, por esgotamento, em uma placa de LB ágar. A placa foi incubada a 37°C, por um período de 16 a 24 horas (*overnight*). Do crescimento resultante, uma colônia isolada, foi semeada em 2 mL de LB líquido e cultivado *overnight* a 37°C sob agitação de 225 rpm. Posteriormente, o cultivo foi inoculado em um frasco com a capacidade de 500 mL contendo 50 mL de meio LB líquido e cultivado a 37°C, sob agitação de 225 rpm, até a densidade óptica a 600 nm (OD600) atingir entre 0,5 e 0,7 (aproximadamente 5×10^7). A seguir o cultivo foi transferido para tubos de centrifuga estéreis com a capacidade de 50 mL e resfriado em banho de gelo por 20 minutos, sendo centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de água milli-Q estéril a 4°C. A amostra foi mais uma vez centrifugada sob as mesmas condições, o *pellet* ressuscitado em 25 mL de glicerol 10% estéril a 4°C, após mais uma centrifugação sob as mesmas condições foi eliminado o sobrenadante, e o *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de glicerol 10% estéril a 4°C para cada 50 mL de meio original. As células eletrocompetentes foram fracionadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidade (alíquotas de 50 µl) e congeladas a -70°C para posterior transformação.

2.3.3. Transformação em *E. coli*

O protocolo de transformação em *E. coli* foi preparado conforme Sambrook & Russel (2001), com algumas modificações. As células eletrocompetentes foram removidas do -70°C e descongeladas em gelo. Para cada transformação utilizou-se 50 μl de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) e 1 μl do produto de ligação ou DNA plasmidial. Com uma ponteira estéril foram misturadas às amostras, agitou-se gentilmente e transferiu-se para uma cubeta de eletroporação, Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad Laboratories) de 0,2 cm de largura, gelada. Acoplada ao eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories), ajustado para as seguintes condições: 25 μFD de capacitância, 200 Ohms de resistência e 2,5 kV de voltagem, a cubeta foi submetida ao pulso elétrico. Imediatamente após o choque elétrico 500 μl de meio LB líquido foi adicionado à cubeta, homogeneizado e transferido para um tubo de microcentrífuga estéril com 1,5 mL de capacidade, o qual foi incubado em agitador orbital a 225 rpm a 37°C por 1 hora. Após este período de incubação, as células transformadas foram centrifugadas em microcentrífuga a 14000 rpm por 1 min. 400 μl do sobrenadante foram removidos e as células ressuspensas no volume restante, o qual foi depositado em placa contendo 20 mL de meio LB ágar acrescidos 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina, o volume depositado sobre a placa foi espalhado por toda a placa com o auxílio de uma alça de Drigalski e posteriormente as placas foram incubadas a 37°C , *overnight*.

2.3.4. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

A extração do DNA plasmidial foi realizada seguindo as instruções do Flexiprep™ Kit (Amershan Biosciences). Utilizando uma ponteira estéril, uma colônia de *E. coli* da placa contendo meio seletivo, foi transferida para 3 mL de meio LB e este incubado “overnight” sob agitação de 225 rpm a 37°C . Após foi transferido 1,5 mL da cultura para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e este foi centrifugado por 1 min a 14.000 rpm. A seguir o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensado em 300 μl de Solução I (100 mM Tris-Hcl pH 7.5, 10 mM EDTA, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase) em vórtex. Após foram adicionados 300 μl da Solução II (1 M NaOH, 3% SDS) e o tubo foi invertido por 10 a 15 vezes. A seguir foram adicionados 600 μl da Solução III (potássio

3 M e acetato 5M) e o conteúdo do tubo foi homogeneizado. A solução foi centrifugada por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para a coluna. Após 30 segundos de incubação, foi centrifugado por 1 minuto a 14.000 rpm. Adicionou-se 400 µl de tampão de lavagem e foi centrifugado sob as mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi desprezado. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e nela foi adicionado 40 µl tampão de eluição pré aquecido (TE 1X), deixando este sistema incubar a temperatura ambiente por 1 min. Após houve uma nova centrifugação para que o DNA passasse da coluna para o tubo. Posteriormente, 1 µl do produto foi analisado em gel de agarose 0,8% para a sua quantificação e o DNA restante foi armazenado a – 20°C.

2.3.5. Seqüenciamento

A identidade do fragmento foi analisada por seqüenciamento do inserto utilizando-se 1 µL de plasmídeo juntamente com o kit de seqüenciamento DYEnamic™ ET termination (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden) conforme protocolo do fabricante. As reações de Seqüenciamento foram analisadas em um seqüenciador automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden). Os fragmentos amplificados na reação de seqüenciamento foram seqüenciados três vezes e a qualidade das seqüências checada pela sobreposição dos fragmentos reunidos utilizando os programas Pred/Phrap/consed (<http://www.phrap.org>). A determinação da seqüência consenso foi feita pelo alinhamento dos produtos obtidos utilizando o programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997). Três diferentes seqüências genômicas foram identificadas.

2.4. Clonagem do gene *bvI* no vetor pGA643

2.4.1. Amplificação do gene

Para a clonagem no vetor pGA643, o gene da lectina de *bvI* foi amplificado por PCR utilizando os primers Bauplanta 1 - 5'(CGGGATCCACAAGCTCAACCTTAAC)^{3'} e Bauplanta 2 - 5'(CGGGGTACCTTACATACTGGAATAAGAG)^{3'} (MWG-Biotech, USA) a

partir do vetor pCR2.1-*bvI* I identificado por seqüenciamento e o produto de PCR utilizado para a ligação em pGA643.

2.4.2. Purificação dos produtos de PCR

As purificações dos produtos de PCR foram realizadas seguindo as instruções do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, UK). Inicialmente foram adicionados no tubo de microcentrífuga contendo o DNA 500 µl de tampão de captura (contendo acetato), a seguir foi transferido para uma coluna contendo um tubo coletor e que foi centrifugada por 1 min a 14.000 rpm. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e foi adicionado, na coluna, 500 µl de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA; etanol para concentração final de 80%). A seguir o sistema foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi descartado. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e nela foi adicionado 40 µl de tampão de eluição (TE 1X), deixando este sistema incubar a temperatura ambiente por 1 min. Após houve uma nova centrifugação para que o DNA passasse da coluna para o tubo. Posteriormente, 3 µl do produto foi analisado em gel de agarose 0,8% e o DNA restante foi armazenado a -20°C.

2.5. Ligação do gene *bvI* ao vetor pGA643

2.5.1. Digestão do vetor pGA643 e do gene *bvI*

Para que as extremidades dos fragmentos amplificados fossem compatíveis com as extremidades dos vetores, foi realizado a digestão do gene *bvI* e do vetor pGA643 com a endonuclease de restrição *XbaI*. A reação de digestão foi realizada em um volume final de 40 µl. Para tal foram utilizados 30 µl de DNA, 1 µl de *XbaI*, 5 µl de água milli-Q e 4 µl do tampão de reação React 2. A reação foi incubada a 37° C, em banho-maria, por 24 h e do produto foram analisado em gel de agarose 0,8%.

Para retirar as impurezas da digestão, foi novamente realizada a purificação do DNA plasmidial com “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, seguindo o protocolo descrito no item 2.4.2.

2.5.2. Tratamento do DNA plasmidial (pGA643) com fosfatase alcalina (CIP)

O vetor plasmidial linear foi submetido ao tratamento com CIP para impedir que suas extremidades religassem. A enzima CIP remove o grupamento fosfato da extremidade 5' do DNA linear, impedindo sua auto-ligação com a outra extremidade. Este procedimento foi realizado adicionando à solução de digestão do vetor duas unidades da enzima CIP, 6 μ L do tampão de reação 1 X e 2 μ L de água Milli-Q estéril para um volume de 35 μ L. Após isto, a solução foi incubada a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora.

2.5.3. Inserção do gene *bvI* no vetor pGA643

O gene *bvI* foi inserido no vetor pGA643 utilizando-se a enzima T4 DNA ligase. A solução de clonagem foi preparada em um tubo de microcentrífuga com a capacidade para 1,5 mL, através da mistura de 5 μ L do incerto, 4 μ L de tampão, 5 μ L do vetor pGA643, 1 μ L de enzima e 5 μ L de água estéril. Posteriormente, a reação ficou a 22 $^{\circ}$ C 12 horas. A reação de ligação foi inserida em *E.coli* Top 10 como descrito anteriormente.

2.6. Transformação de *A. tumefaciens* LBA4404

2.6.1. Preparação de células competentes de *A. tumefaciens*

A cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* desarmada foi crescida em 5 mL de meio de YEB, preparado como descrito por Brasileiro & Carneiro (1998), suplementado com rifampicina 50 mg/L, pH 7,0. As culturas foram mantidas sob agitação (150 rpm), a 28 $^{\circ}$ C, por um período de 16 a 18 horas. Após este período, 1mL da cultura foi inoculado em 50 mL de YEB e mantidas sob agitação (150 rpm), a 28 $^{\circ}$ C, por um período de 12 horas até uma DO₆₀₀ entre 0,5 e 1,0. A cultura foi mantida por 15 min. Em gelo e posteriormente centrifugada a 5 000g em centrifuga SORVAL e rotor SS34 por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado com 1 mL de Cloreto de Cálcio 0,1M gelado.

A cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada para a transformação por choque térmico (BRASILEIRO *et. al.*, 1998). A bactéria foi crescida em meio de Luria-Bertani broth (LB) (bactotripton, 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L;

cloreto de sódio, 10 g/L e ágar 14 g/L), suplementado com canamicina, 50 mg/L e rifampicina 50 mg/L, pH 7,0. As culturas foram mantidas sob agitação (150 rpm), a 28°C, por um período de 16 a 18 horas. As bactérias transformadas foram selecionadas e conservadas em criotubos, em nitrogênio líquido, para posterior uso em transformação de plantas visando resistência a insetos.

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção e preparação do gene *bvI*

3.1.1. Amplificação do gene *bvI*

Utilizando primers específicos construídos com base na seqüência do gene *bpa*, foi amplificado por PCR (item 2.2.2) a partir de DNA genômico de *B.variegata*, um fragmento de aproximadamente 870 pb, tamanho compatível com o tamanho esperado, como pode ser observado na figura (Figura 2).

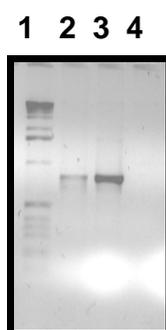


FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, dos produtos da amplificação do gene *bvI* por PCR. **Coluna 1.** Marcador de Massa Molecular 1 kb DNA Ladder; **Coluna 2.** produto do PCR (876 pb) usando 1 µL de DNA; **Coluna 3.** produto do PCR (876 pb) usando 2 µL de DNA. **Coluna 4.** controle negativo.

Analisando-se a figura acima, verifica-se que houve boa amplificação do gene *bvI* evidenciado pela presença de uma única banda de DNA na amostra e sua ausência no controle negativo. Ao analisar a intensidade da banda se verifica que a quantidade de DNA também está dentro do esperado.

3.2. Clonagem do gene *bvl* I sistema TOPO TA

O produto de PCR foi utilizado para ligação ao vetor pCR2.1 e transformado em *E. coli* TOP 10 por eletroporação. Para detectar quais as colônias que apresentavam o gene *bvl* I foi realizado uma triagem rápida com fenol:clorofórmio (figura 3). As colônias que apresentaram no gel de agarose um DNA plasmidial com um tamanho maior que o DNA plasmidial do controle (que possuía apenas o vetor) supostamente possuíam o gene *bvl* I. As colônias que apresentaram o inserto foram expandidas em meio de cultura e o seu DNA extra cromossomal foi extraído como descrito anteriormente, o produto da extração plasmidial foi analisado em gel de agarose 0,8% (figura 4).

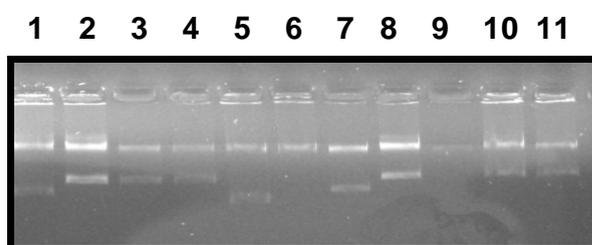


FIGURA 3. Detecção rápida de colônias com o plasmídeo pCR2.1/*bvl* I com fenol:clorofórmio. **Colônia 1.** Controle negativo; **Colônias 2, 3, 4, 8, 10 e 11:** clones recombinantes; **Colônias 5, 6, 7 e 9:** clones não recombinantes

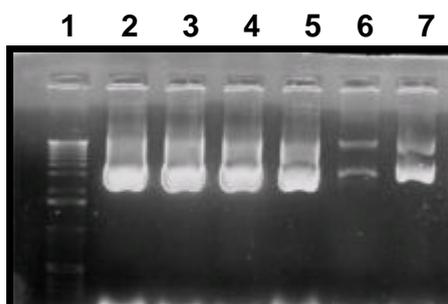


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com os produtos da extração do plasmídeo pCR2.1/*bvl* I.

3.3. Seqüenciamento dos clones selecionado

Os clones selecionado pela triagem foram submetidos a seqüenciamento de DNA para confirmação da presença do gene. Após a análise das seqüências obtidas, três diferentes isoformas foram identificadas. Em função da similaridade com as lectinas BPA e GSI, um desses genes (*bvl 1*) (Figura 5) foi escolhido para transformação de uma variedade de alface.

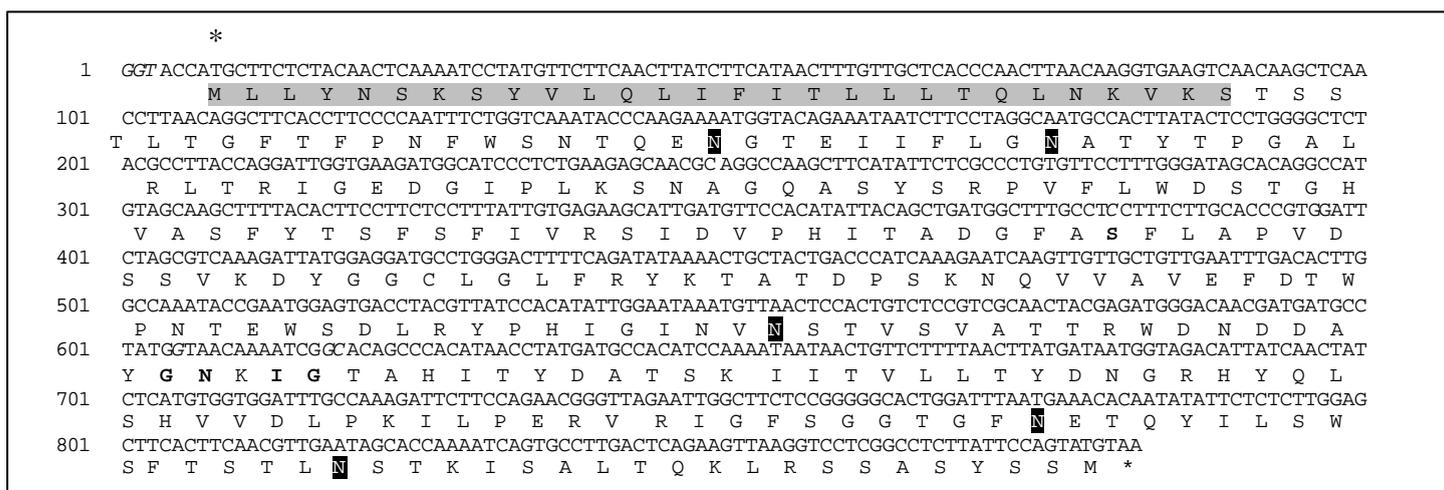


FIGURA 5. Seqüência nucleotídica e de aminoácidos deduzidos do clone de cDNA da BVL. O códon de iniciação e o sítio de terminação estão indicados por um asterisco. A seqüência sinal está indicada pela região sombreada (aminoácidos 1-28). Os supostos sítios de glicosilação estão marcados em preto. Os nucleotídeos modificados em relação a *B. purpurea* estão indicados em itálico e os aminoácidos modificados estão indicados em negrito.

A análise usando o software SignalP identificou um peptídeo sinal de 28 aminoácidos nas seqüências protéicas previstas, resultando em uma proteína madura de 263 aminoácidos, com massa molecular de 28.963 Da, além de dois domínios conhecidos para lectinas de leguminosas (Figura 6).

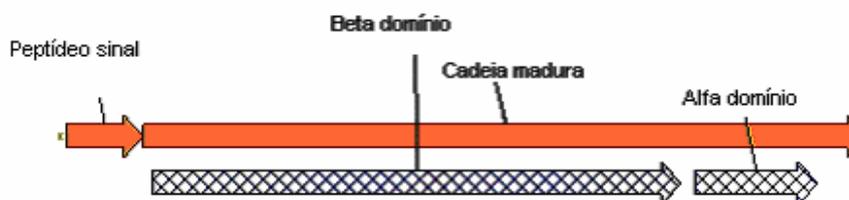


FIGURA 6. Representação esquemática da estrutura da lectina BVL e suas respectivas regiões.

3.4. Clonagem do gene *bvl* I em vetor de expressão em planta

3.4.1. Amplificação do gene *bvl* I para clonagem em pGA643

Para a clonagem no vetor pGA643, o gene da lectina de *bvl* I foi amplificado por PCR utilizando os primers Bauplanta 1 e Bauplanta 2, que possuem sítio de restrição para a enzima *Xba*I, a partir do vetor pCR2.1/*bvl* I identificado por seqüenciamento e o produto de PCR utilizado para a ligação em pGA643. Cinco reações foram realizadas e então reunidas para a digestão com a enzima *Xba* I.

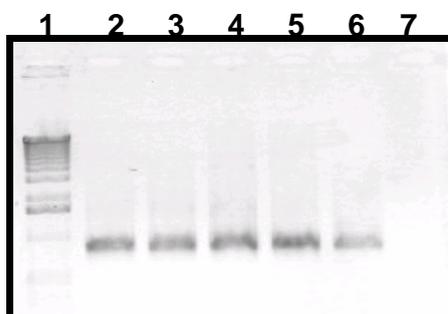


FIGURA 7. PCR do gene *bvl* I a partir do vetor pCR 2.1/*bvl* I utilizando os primers Bauplanta 1 e Bauplanta 2 com sítio de restrição para *Xba* I. **Coluna 1.** Marcador , **Colunas de 2 a 5.** gene *bvl* I, **Coluna 6.** reação negativa.

3.4.2. Construção do plasmídeo pGA643/*bvl* I

Para a construção do vetor de expressão pGA643/*bvl* I, o plasmídeo purificado foi digerido com a enzima de restrição juntamente com o gene amplificado com os primers Bauplanta 1 e 2. O esquema de construção deste plasmídeo encontra-se na Figura 8.

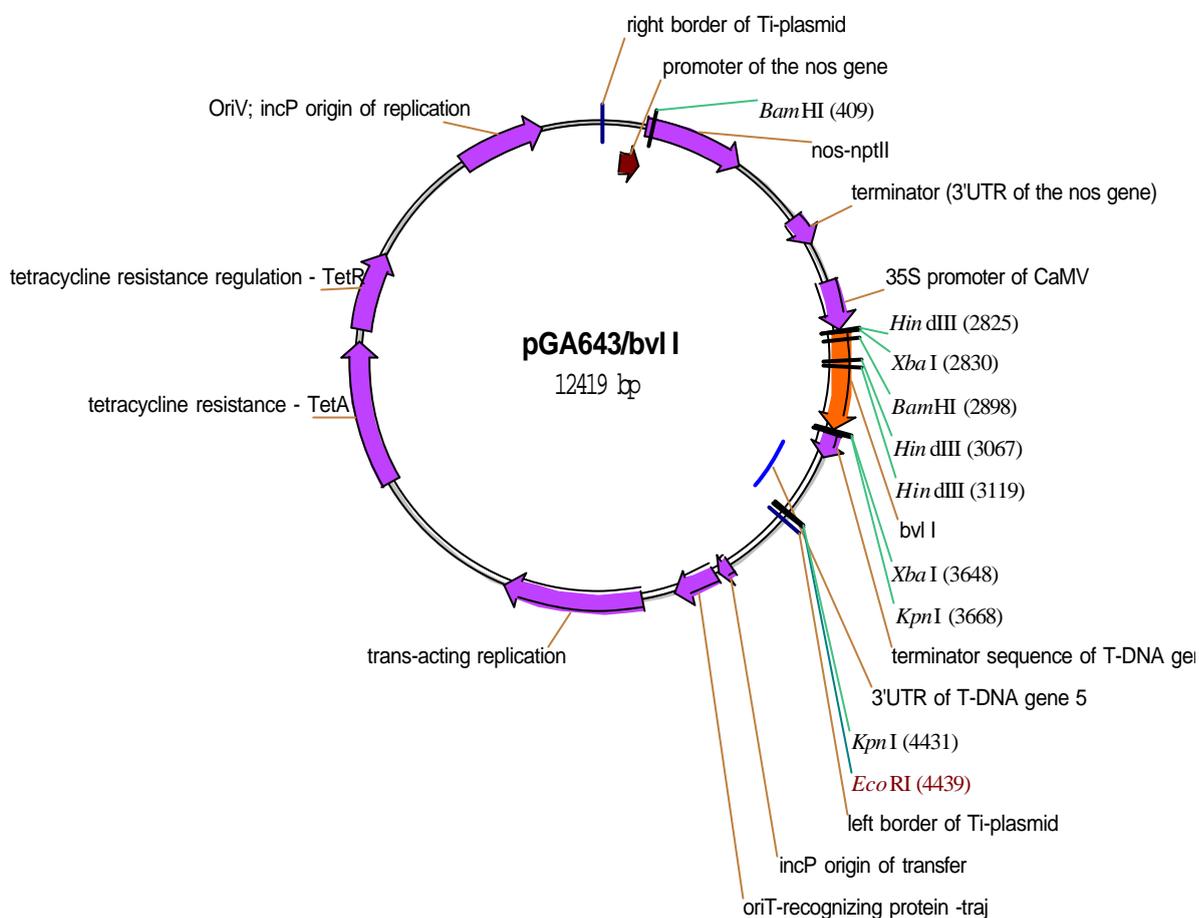


FIGURA 8. Desenho esquemático do vetor pGA643/bvl I gerado pelo software VectorNTI 8.0 (Informax).

A digestão do vetor é apresentada na Figura 9 juntamente com a purificação do inserto após a digestão com a mesma enzima. Nesta figura é possível observar que a digestão do vetor foi realizada com sucesso, possibilitando assim a continuidade das etapas seguintes.

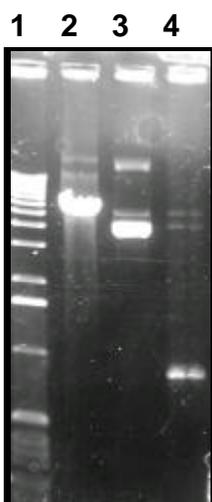


FIGURA 9. Eletroforese da digestão do vetor pGA643 e do gene *bvI* com a enzima de restrição *Xba* I. **Coluna 1.** Marcador de massa molecular. **Coluna 2.** pGA643 digerido. **Coluna 3.** pGA643 não digerido. **Coluna 4.** Gene *bvI* digerido.

3.4.3. Ligação do vetor pGA643 ao gene *bvI*

A reação de ligação foi realizada como descrito anteriormente e então utilizada para transformar *E. coli* TOP 10 por eletroporação. Para detectar quais as colônias que apresentavam o gene *bvI* ligado ao vetor pGA643 foi realizada uma triagem por PCR utilizando iniciadores específicos (figura 10). As colônias que apresentaram no gel de agarose uma amplificação com tamanho semelhante ao do controle positivo da reação, supostamente possuíam o gene *bvI*.

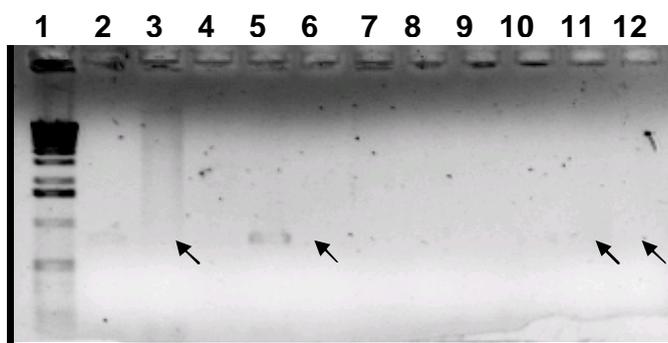


FIGURA 10. PCR de colônia de *E. coli* TOP 10 transformadas com a reação de ligação de *bvI* e pGA643.

Uma das colônias que apresentaram amplificação, foi cultivada e submetida à extração de DNA plasmidial. Para comprovar que este plasmídeo era composto pelo vetor pGA643 e pelo gene *bvl* I, o clone foi submetido a clivagem com enzima de restrição (figura 11).



FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão com as endonucleases de restrição com *Xba* I do vetor pGA643. **Coluna 1.** Vetor não digerido. **Coluna 2.** Vetor digerido com *Xba* I. **Coluna 3.** Vetor digerido com *Xba* I e liberação do inserto.

3.4.5. Confirmação da orientação do gene no vetor pGA643

A verificação da recombinação correta entre vetor e inserto foi realizada por seqüenciamento para o qual desenharam-se primers no programa Vector NT Suite 8.0. Os primers BAUSEQ-1 $5'(\text{ACACTTGGCCAAATACCG})^3'$ e BAUSEQ-2 $5'(\text{AACGATGTACCGGACACG})^3'$ foram desenhados para amplificarem fragmentos que mostrassem a região de ligação do inserto com o vetor e a correta fase de leitura. Os primers bauplanta-1 e 2 também foram usados para melhor identificação dos fragmentos (Figura 12).

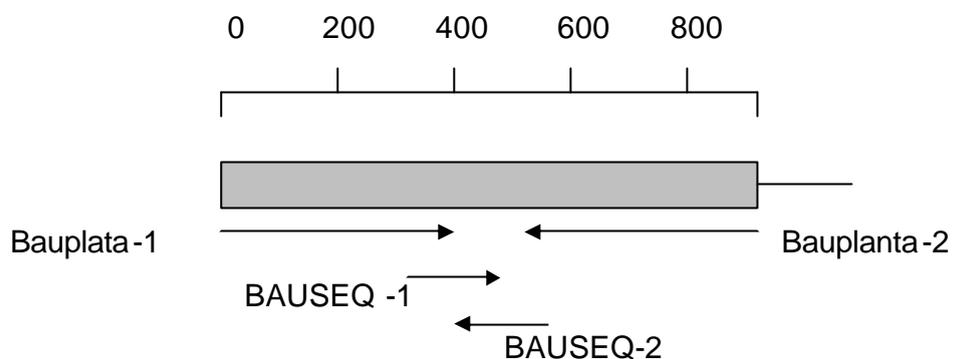


FIGURA 12. Região de anelamento dos primers e estratégia de seqüenciamento. As setas indicam a direção do seqüenciamento.

Após a confirmação da presença do gene *bvl* I ligado ao vetor pGA643, o plasmídeo recombinante foi submetido a transformação em *A. tumefaciens*.

3.5. Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

O plasmídeo recombinante extraído de *E. coli* foi utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. As colônias recombinantes foram utilizadas como DNA molde para um “PCR screening” para verificar a presença do inserto (Figura 13).

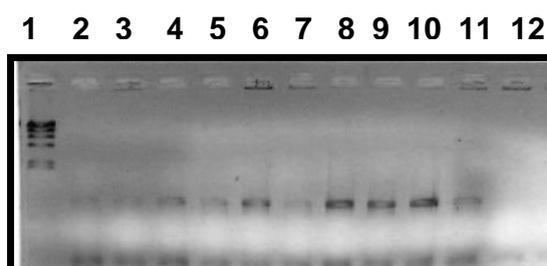


FIGURA 13. Confirmação dos clones recombinantes de *A. tumefaciens* pela técnica de PCR. **Coluna 1.** Marcador de massa molecular, **Colunas de 2 a 10.** *bvl* I pGA643, **Coluna 11.** controle positivo, **Coluna 12.** controle negativo.

Com base na figura acima, pode-se verificar que a transformação de *A. tumefaciens* com a construção pGA643/bv1 I foi realizada com sucesso. No controle negativo não ocorreu a amplificação e no controle positivo houve a amplificação da banda na altura esperada. Estas colônias foram armazenadas em meio de cultura e uma concentração final de 10% de glicerol para evitar a lise celular por cristais de gelo. Este material será utilizado em etapas seguintes de transformação genética de plantas modelo, com destaque para alface (*Lactuca sativa*).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivamos desenvolver um sistema de expressão em plantas para a lectina BVL I de *B.variegata*. Essa proteína possui características semelhantes às demais lectinas de leguminosas bem como elevada identidade com as lectinas de *G.simplicifolia* e *B.variegata* que possuem, entre outras propriedades biológicas, atividade inseticida (ZHU, *et al.*, 1996), Estes mesmos autores sugerem que estas lectinas poderiam incrementar um sistema de defesa em plantas de interesse agrônomico quando utilizadas visando a construção de plantas transgênicas resistentes a insetos. Além disso, essas plantas têm a propriedade de apresentar resistência a determinados fungos fitopatogênicos como já tem sido demonstrado (CHENA *et al.*, 2005) e por estudos prévios realizados por nosso grupo com a lectina rBVL I expressa em *E.coli* (dados não mostrados).

Para alcançar os objetivos propostos, inicialmente utilizou-se uma estratégia de amplificação direta do gene via PCR e clonagem do produto em vetor de clonagem. Esta estratégia propiciou a identificação de diferentes isoformas para a lectina BVL da mesma forma que foi demonstrado para as lectinas de *G. simplicifolia* (ZHU *et al.*, 1996) e *B. purpurea* (KUSUI *et al.*, 1991).

Por seqüenciamento de DNA e pela estrutura primária predita, verificou-se que BVL exibe uma identidade elevada com o BPA de 99%. As diferenças principais entre resíduos da proteína da lectina de *B. purpurea* e as lectinas de *B. variegata* ocorrem em função de inserções nas posições 605, 617 e 618 na seqüência gênica, resultando em um aminoácido na posição 205 na proteína madura em relação a lectina BPA. Esta elevada identidade demonstra que a estrutura predita para estas lectinas foi conservada durante a evolução e são importantes para a manutenção dessas plantas. Além disso, a estrutura preliminar da *BVL* mostra a conservação da maioria das características desta família de proteínas, principalmente quanto à estrutura dos domínios alfa e beta.

Para a transformação futura de alface, optamos por utilizar o vetor binário pGA643 (AN *et al.*, 1988), com o cassete de expressão possuindo o gene de interesse

(*bvI I*) sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve flor (P35SCaMV) além do gene *nptII* que confere resistência à canamicina. Entre o promotor e o terminador encontram-se sítios de restrição para a endonucleases. A inserção do gene *bvI I* verificou-se por meio do uso de endonucleases de restrição *XbaI* e pode ser verificado sua orientação por seqüenciamento. Esse promotor tem sido utilizado com sucesso na expressão de diferentes proteínas de interesse (AN *et al.*, 1988; DOWN *et al.*, 2001). Assim, o vetor pGA643-*bvI I* pôde ser transferido para *Agrobacterium tumefaciens* e esta será responsável pela transferência do DNA recombinante à planta.

Com uma apropriada estratégia tecnológica, o vetor de expressão de planta codificando para o gene *bvI I* foi construído e representa um significativo avanço visando a produção de resistência a insetos em plantas e principalmente na concretização de um protocolo de transformação de plantas em nosso laboratório dando suporte a outros trabalhos de transformação genética de plantas.

5. CONCLUSÃO

Pelo exposto, é possível concluir que a estratégia para a construção de um vetor de expressão em plantas foi realizada com sucesso sendo possível a transformação genética de alface bem como outras espécies vegetais a fim de obter a resistência a insetos incidentes nas culturas em que esta construção seja utilizada. Além disso, até agora, estas etapas do trabalho possibilita o acúmulo de conhecimento importante para a consolidação de protocolos de construção de vetores e a transformação genética de plantas em nosso laboratório.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.R. (1993) **Plantas Medicinais brasileiras, conhecimentos populares e científicos**. Hemus Editora Ltda.: São Paulo, Brasil. 60p.

NA, G.; WATSON, B.D.; CHIANG, C.C. (1988) **Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary T1 vector system**. Plant Physiol 81:301–305

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, P.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. (1999) **Lectin-induced nitric oxide production**. Cellular Immunology, v. 194, p. 98–102.

ARAGÃO F. J. L.(2002) **Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance**. JIRCAS Working Report Genetic Engineering of Crop Plants for Abiotic Stress, v. 23, p. 35-42.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G. J.; SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. (1997) **Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans**. Mediators of inflammation, v. 6, p. 201-210.

BARONDES, S. H. (1988) **Bifunctional properties of lectins: lectins redefined**. TIBS, 13:480-482.

BARRAL-NETTO, M.; VONSOHSTEN, R.L.; TEIXEIRA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. (1996) **"In vivo" protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis***. Acta Tropica, Basel, 60:237-250.

- BERNARDES, A. (1984) **A Pocketbook of Brazilian Herbs**, A Shogun Editora e Artta Ltda: Rio de Janeiro, Brazil. 55p.
- BOYD, W. C. & SHAPLEIGH, E. (1954) **Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins)**. Science, Washington, 119:419.
- BOWERS, N.; PRATT, J. R.; BEESON, D.; LEWIS, M. (1997) **Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates**. Environmental Toxicology and Chemistry, Elmsford, NY, v. 16, p. 207-213.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.) (1998) **Manual de Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA, Brasília. 103p
- BURKART, A. (1952) **Las Leguminosas argentinas silvestres y cultivadas**. 2^a ed. ACME Agency. p. 158-160.
- CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANGEIRO, T.B. (1993) **Primary structures and functions of plant lectins**. Revista Brasileira Fisiologia Vegetal, Brasilia, 5:193-201.
- CHENA, Z.; SUNA, X.; TANGA, K. (2005) **Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-binding lectin from *Dendrobium officinale***. Toxicon 45, 535–540.
- CHRISPEELS, M.J. & RAIKHEL, N.V. (1991) **Lectins, lectin genes, and their role in plant defense**. Plant Cell, Rockville, 3:1-9.
- CRUZ, G.L. (1995) **Dicionário das plantas úteis do Brasil**, 5th ed., Bertrand: Rio de Janeiro, Brasil. 599p.
- CURTIS, I. S.; POWER J. B.; BLACKHALL, N. W.; LAAT, A. M. M.; DAVEY, M. R. (1994) **Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens***. Journal of Experimental Botany, Oxford, UK, v. 45, p. 1441–1449.

CZAPLA, T.H.; B.A. LANG. (1990) **Effect of plant lectins on the larval development of european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)**. J. Econ. Entomol. 83(6):2480-2485.

DIXON, H.B.F. (1981) Defining a lectin. **Nature**, London, 290:188.

DOWN, R. E.; FORD, F.; BEDFORD, S.; GATEHOUSE, L.; NEWELL, C.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. (2001) **Influence of plant development and environment on transgene expression in potato and consequences for insect resistance**. Biomedical and Life Sciences, v. 10, 223-236.

GATEHOUSE, A.M.R.; B.H. MINNEY; P. DOBIE; V.A. HILDER. (1990) **Biochemical resistance to bruchid attack in legume seeds: Investigation and exploitation**. In: FUJII, K.; A.M.R. GATEHOUSE; C.D. JOHNSON; R. MITCHEL; T. YOSHIDA. (Eds.) *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*, Amsterdam, Kluwer Academic. p. 242-256.

GRANGEIRO, T.B. (1996) **Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis***. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 134 p. (Tese de Doutorado).

HERBOPER, S.A. (1997) **Package inserts and instructions for use for packaged medicinal plants sold by Herboper, SA., Lima, Peru**. 57p.

KILPATRICK, D.C.; VAN DRIESSCHE, E.; BOG-HANSEN, T. C. (1986) (Eds). **Lectins Reviews**. Sigma chemical company, 1:143-160.

KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. (1981) **Defining a lectin**. Nature, London, 290:188-189.

KUSUI, K., YAMAMOTO, K., KONAMI, Y. AND OSAWA, T. (1991) **cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin**. Journal Biochemistry, Tokio, 109:899-903.

LIENER, I.E. (1976) **Phytohemagglutinins (Phytolectins)**. Annual Revil Plant Physiology, 27: 291-319.

LOVATO, F. A.; BEZERRA I. C.; RESENDE, R. O.; FERREIRA, A. T.; TORRES, A. C. (1998) **Genetic transformation of lettuce cv. Veronica by *Agrobacterium tumefaciens***. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasília, v. 10, p. 219-224.

MARTINS, R. E.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. (1998) **Plantas Medicinais**, Viçosa: Ed. UFV, 155 p.

PEREZ, G.; PEREZ, C.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; RICHARDSON, M. (1991) **Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmani* and *Canavalia maritima***. Phytochemistry, Elmsford, 30:2619-2621.

NOGUEIRA, N. A. P.; GRANGEIRO, M. B.; CUNHA, R. M. S.; RAMOS, M. V.; ALVES, M. A. O.; TEIXEIRA, E. H.; BARRAL-NETTO, M.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B. (2002) **Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis* lectin) produced in *Escherichia coli* cells**. Protein and Peptide Letters, v. 9, n. 1, p. 59-66.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. (1995) **Lectins as plant defense proteins**. Plant Physiology, Maryland, 109:347-352.

RAEMAEKERS, J. M. R.; MURO, L.; GATEHOUSE, J. A.; FORDHAM-SKELTON, A. P. (1999) **Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide**. European Journal of Biochemistry, v. 265, p. 394-403, FEBS.

RAHBÉ, Y.; N. Sauvion; G. FEBVAY; W.J. PEUMANS; A.M.R. GATEHOUSE. (1995) **Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*)**. Entomol. Exp. Appl. 76:143-155.

RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; MAZARD, A.; ROUGÉ, P. (2002) **Interaction of Diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97(2): 275-279.

RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BOMFIM, L. R.; DEBRAY, H.; MAZARD, A.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B.; ROUGÉ, P. (1999) **Interaction of the seed lectin from *Parkia platycephala* (mimosoideae) with carbohydrates and complex glycans.** Protein and Peptide Letters, v. 6, n. 4, p. 215-222.

RAMOS, M.V.; Mota, D.; TEIXEIRA, C.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A. (1998) **Isolation and partial characterization of highly lectins from *Abrus pulchellus*.** Toxicon, Elmsford, 36:477-484.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F.D.A.P.; MOREIRA, R.A.; AINOUS, I. L.; BEGBIE, R.; WATT, W. B; PUSZTAI, A. (1984) **The complete amino acid sequence of the major ? subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.).** European Journal Biochemistry, Berlin, 144:101-111.

ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YARWOOD, A.; CAVADA, B. S. (1987) **Single and two chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation.** Biochemical Systematics and Ecology, Oxford, 15: 341-348p.

SAMPAIO, A.H. (1997) **Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species.** University of Portsmouth, Inglaterra, 191p. (Ph.D. Thesis).

SHARON, N. & LIS, H. (1989) **Lectin as Cell Recognition Molecules.** Science, Washinton, 246:227-234, (b).

SHARON, N. & LIS, H. (1989) **Lectins.** London: Chapman and Hall, (a).126p.

SHARON, N. & LIS, H. (1990) **Legume lectins, a large family of homologous proteins.** FASEB Journal, 4:3198-3208.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, T. (2001) **Molecular cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SHERWANI, A. F.; MOHMOOD, S.; KHAN, F.; KHAN, R. H.; AZFER, A. (2003) **Characterization of lectins and their specificity in carcinomas - an appraisal.** Indian Journal of Clinical Biochemistry, v. 18 (2): 169-180.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. (1995) **Plantas Medicinais da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 4^a ed. Editora da Universidade/UFRGS. Porto Alegre, 593p.

STILLMARK, H. (1888) **Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen**. Inaugural Dissertation Dorpat, Tartu.

VAN DAMME, E.J.M.; GOOSSENS, K.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; VERHAERT, P.; PEUMANS, W.J. (1995) **The major tuber storage protein of Araceae species is a lectin**. *Plant Physiology*, Maryland, 107:1147-1158.

YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. (1991) **Purification and characterization of a carbohydrate-binding peptide from *Bauhinia purpurea* lectin**. *FEBS Letters*, Amsterdam, 281, 258-262.

YAMAUCHI, D. & MINAMIKAWA, T. (1990) **Structure of the gene encoding *Concanavalin A* from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cell**. *FEBS Letters*, Amsterdam, 260:127-130.

YAMAUCHI, D.; NAKAMURA, K.; ASAHII, T.; MINAMIKAWA, T. (1989) **Nucleotide sequence of cDNA for *Concanavalin A* from *Canavalia gladiata* seeds**. *Plant Cell Physiology*, 30:147-150.

YOUNG, N.M.; WATSON, D.C.; WILLIAMS, R.E. (1985) **Lectins and legume chemotaxonomy. Characterisation of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Bauhinia purpurea***. *FEBS Letters*, Amsterdam, 182:403-405.

WANG, W.; HAUSE, B.; PEUMANS, W. J.; SMAGGHE, G.; MACKIE, A.; FRASER, R.; VAN DAMME, E. J. M. (2003) **The Tn antigen-specific lectin from Ground Ivy is an insecticidal protein with an unusual physiology**. *Plant Physiology*, v. 132, p. 1322–1334.

WINICOV, I.; BASTOLA, D. R. (1999) **Transgenic Overexpression of the Transcription Factor *Alfin1* Enhances Expression of the Endogenous *MsPRP2***

Gene in Alfalfa and Improves Salinity Tolerance of the Plants. Plant Physiol; 120(2): 473–480.

ZENTENO, E.; OCHOA, J.L.; MONTANO, L.F.; DEBRAI, H.; MONTREUIL, J. (1991) ***Machaerocereus eruca* cactus isolectins. Purification and characterization.** Plant Science, Calcuta, 77:11-19.

ZHU, K.; HUESING, J.E.; SHARE, R.E.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; MURDOCK, L. (1996) **An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae).** Plant Physiology, v. 110, p. 195-202.